

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/087363 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/82, 16/32
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04699
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 14 日 (14.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-111377 2002 年 4 月 12 日 (12.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人
久留米大学 (GAKKOUHOJIN KURUME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒830-0011 福岡県 久留米市 旭町 6 7
Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 常岡 誠 (TSU-
NEOKA, Makoto) [JP/JP]; 〒830-0006 福岡県 久留
米市 南薫西町 2 0 2 4 Fukuoka (JP). 木村 博司
(KIMURA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒830-0045 福岡県 久留米
市 小頭町 1 1-3-9 0 2 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 佐野 邦廣, 外 (SANO, Kunihiro et al.); 〒
101-0052 東京都 千代田区 神田小川町 3 丁目 2 番
1 0 号 三光ビル 5 階 あすなろ特許事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

WO 03/087363 A1

(54) Title: CANCER-ASSOCIATED GENE MINA 53, PROTEIN MINA 53 AND MONOCLONAL ANTIBODY THEREOF

(54) 発明の名称: がん関連遺伝子 mina 53、タンパク質 Mina 53 およびそのモノクローナル抗体

(57) Abstract: Myc protein is an unevenly distributed intermediate agent for cell proliferation, and activates a gene expression via E-box. Mina 53 gene encodes a protein of 53 kDa molecular weight and is present in the karyoplasm and nucleolus. Mina 53 mRNA and protein expression are induced by artificial introduction of c-Myc activity. E-box site is present in the vicinity of the transcription initiation site of mina 53 gene, and the expression from mina 53 promoter is activated by the c-Myc through the medium of E-box. Specific inhibition of the mina 53 expression in HeLa cells and rat fibroblast cells 3Y1 having high expression c-myc strikingly inhibited the cell proliferation. Combination of these results shows that the mina 53 is a Myc target gene and is associated with the cell proliferation of mammal.

[続葉有]

1
明 細 書がん関連遺伝子 *mina 53*、タンパク質 *Mina 53* および

そのモノクローナル抗体

技術分野

この発明は、がん関連遺伝子 *mina 53*、タンパク質 *Mina 53* およびそのモノクローナル抗体に関する。

背景技術

がんは、致命的な自然経過をたどる細胞性腫瘍であり、ヒトの死亡原因の大きな割合を占めていて、それも増加する傾向がある。がん細胞は、元来は正常細胞であり、その正常細胞の遺伝子が、例えば、化学物質や放射線、またはウイルスの感染などの何らかの原因によって、その遺伝子のDNAが傷つき、修復されずに蓄積されると、その正常細胞ががん化すると考えられている。細胞には、傷ついた遺伝子を修復する機構が備わっているが、この仕組みが正常に機能しなければ、異常な遺伝子が蓄積することになる。がんに関係する遺伝子も数多く見つかっていて、かかる遺伝子の中には、がんを促進するがん遺伝子と、がんを抑制するがん抑制遺伝子とがある。

かかるがん関連遺伝子の1つのファミリーである前がん遺伝子 *myc* ファミリーは、特にがんとの関連が古くから知られていて、がんや、個体発生などにおいて重要な役割を果たしている細胞増殖関連の遺伝子であり、この遺伝子の異常がヒトがんにおいて非常に高い割合で見つまっている。

このがん遺伝子 *c-myc* ファミリーは、主に3つの遺伝子、*c-myc* と、*N-myc* と、*L-myc* とから構成されているが、これら3つの遺伝子は、発現する場所とタイミングは異なっているが、基本的には同じ生物学的活性を持つと考えられている。このがん遺伝子 *c-myc* の発現は、転写レベルと転写後レベルなどのレベルで高度に調節されている。一般的には、*c-myc* の発現は、細胞増殖に関連していて、静止期にある細胞あるいは分化細胞中においてその発現が低下する。遺伝子増殖、ウイルスプロモーター挿入、染色体の転座もしくはプロモーター突然変異などによって、*myc* ファミリー遺伝子が脱調節されて異常に発現することは、ヒトなどの広い範囲の脊椎動物における新形成疾患（いわゆる腫瘍形成等）に関連している (DePinho, R. A., et al.: (1991) Adv. Cancer Res. 57, 1-46; Marcu, K. B., et al.: (1992) Annu. Rev. Biochem. 61, 809-860; Morgenbesser, S.D., et al.: (1994) Semin. Cancer Biol. 5, 21-36; Henriksson, M., et al. (1996) Adv. Cancer

Res. 68, 109-182; Grandori, C., et al.: (2000) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16, 653-99)。c-mycもしくはN-mycをノックアウトしたマウス胎児は、胚発生中期の間に多臓器発育不全を誘発し死亡する (Stanton, B.R., et al.: (1992) Genes Dev 6, 2235-2247; Sawai, S., et al. (1993) Development 117, 1445-1455; Davis, A.C., et al.: (1993) Genes Dev. 7, 671-682)。これらの結果は、mycが細胞発育の中心的調節因子であることを示している (Henriksson, M., Luscher, B.: (1996) Adv. Cancer Res. 68, 109-182; Grandori, C., et al.: (2000) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16, 653-99; Luscher, B.: (2001) Gene 277, 1-14)。

このがん遺伝子mycファミリーの遺伝子は、種々の遺伝子の発現を調節する転写因子 (My cタンパク質) をコードしている (Grandori, C., et al.: (2000) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16, 653-99; Luscher, B.: (2001) Gene 277 (Oct 17; (1-2):), 1-14)。mycファミリー遺伝子がコードしているタンパク質は、ベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLHLZ) クラスの転写因子の1員である。My cタンパク質とその必須相手のMaxとの2量体は、配列特異的DNA結合活性を有するヘテロ2量体を形成する。この2量体は、ベーシック部分を介してE-ボックス部位 (主にCACGTGエレメント) に結合する。mycにはその他に転写活性化 (transactivation) ドメインがあり、これらのドメインの働きを通して遺伝子の転写を活性化する。例えば、ODC (Bello-Fernandez, C., et al.: (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7804-7808)、cdc25A (Galaktionov, K., et al.: (1996) Nature 382, 511-517)、RCC1 (Tsuneoka, M., et al.: (1997) Oncogene 14, 2301-2311)、cyclin D2 (Bouchard, C., et al.: (2000) Genes & Dev 15, 2042-2047)、Id2 (Lasorella, A., et al.: (2000) Nature 407, 592-598) などのMy c標的遺伝子が同定されている (Dang, C.V.: (1999) Mol. Cell. Biol. 1-11)。機能を持つc-myc遺伝子を完全に欠損した細胞に、発現遺伝子ライブラリーを導入して正常な増殖を再確立する遺伝子を同定しようとしても、c-mycならびにN-mycが繰返えされるだけで別の遺伝子は同定することができなかった。これらの結果は、mycが単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子を制御して細胞増殖を調節していることを示唆している。しかし、がん遺伝子mycの機能を解明するのに十分なMy c標的遺伝子が未だ同定されておらず、mycの機能発揮のメカニズムは十分には明らかにされていない。従って、mycによって発現調節される新規な遺伝子を同定することは、がん遺伝子mycの機能を解明するのに役立つ。

がんのうちでも、大腸がんは、西洋において最も頻繁に発生している。現在では、ある種の大腸がんは全く新しく発生するけれども、ほとんどの大腸がんは既存の腺腫から発生するものと考えられている

(Fearon, E.R., Vogelstein, B.: *Cell* 1990, 61:759-767; Kuramoto, S., Oohara, T.: *Cancer* 1989, 64:950-955; Bedenne, L., et al.: *Cancer* 1992, 69:883-888; Wada, R., et al.: *Cancer* 1996, 77:44-50)。すなわち、ほとんどの大腸がんは、正常状態から前がん状態（腺腫）、がん状態へという一連の組織学的変化を徐々にしながら発生することが知られている (Fearon, E.R., Vogelstein, B.: *ibid.*; Vogelstein, B., Kinzler, K.W.: *Trends Genet* 1993, 9:138-141; Kinzler, K.W., Vogelstein, B.: *Cell*, 1996, 87:159-170)。がんが進行する過程では、一般的には、あまり分化していない（以下、「低分化」ともいう）腫瘍が、中程度に分化した（以下、「中分化」ともいう）腫瘍もしくはそれ以上分化した、つまり高度に分化した（以下「高分化」ともいう）腫瘍よりも速い速度で進行するものと考えられている。

大腸がんに関連した遺伝子を解明する研究によって、腫瘍サプレッサー遺伝子の機能損失ならびに腫瘍遺伝子の活性化や発現異常が発がんに関与していることが示されている。前がん遺伝子 *myc* ファミリー *c-myc* は、ヒト大腸がんのほとんどで過剰発現されるとの報告があり (Stewart, J., et al.: *Br J Cancer* 1986, 53:1-6; Sikora, K., et al.: *Cancer* 1987, 59: 1289-1295)、そのほとんどが腫瘍サプレッサー腺腫様結腸ポリープ症 (APC) 遺伝子突然変異を有していると報告されている (Cottrell, S., et al.: *Lancet* 1992, 340: 626-630; Miyoshi, Y., et al.: *Hum Mol Genet* 1992, 1: 229-233; Powell, S.M., et al.: *Nature* 1992, 359: 235-237)。

近年、APC経路の標的として *c-myc* が特定され、大腸がんにおいて *c-myc* を過剰発現する機構を理解するための分子フレームワークが提供されている (He, T. C., et al.: *Science* 1998, 281:1509-1512)。 *c-myc* 発現がAPC遺伝子の機能損失によって惹起されたりまたは機能的なAPC遺伝子産生物によって抑制されたりすることはこのフレームワークを指示している。

大腸発がん発生における *c-myc* の役割が鋭意調べられているけれども、 *c-myc* 遺伝子の異常発現が発がんに関与する機構は未だ十分には解明されてなく、多くの側面が未だ謎のままである (Lutz W, et al.: *Biochim Biophys Acta* 2002, 1602:61-71)。 *c-myc* 遺伝子は、多機能性遺伝子であり、細胞分裂、細胞生育、アポトーシスなどの機能に関連している。 *c-myc* 遺伝子はまたいくつかの遺伝子の発現を調節するとともに、そのいくつかは発がんに関連している上記機能を仲介する働きをしている。したがって、 *c-myc* 遺伝子によって調節される新規遺伝子の機能的情報ならびに発現パタ

ーンを解析することは、c-myc遺伝子によって生起される大腸発がんをより一層理解することに役立つものと考えられる。

大腸がんに加えて、我が国では食道がんも多いがんのひとつである。その患者数は加齢と共に急激に増加する。現在では、食道がんで亡くなる患者数はがんで亡くなる総患者数の約3%に達している。これから迎えられる高齢化社会において食道がんが更に増えることが危惧され、食道がんも国民の健康を考える上で重要な病気である。

食道がんに関連した遺伝子を解明する研究によって、腫瘍サプレッサー遺伝子の機能損失ならびに腫瘍遺伝子の活性化や発現異常が発がんに関与していることが示されているが、c-mycもその発現異常が報告されている (Kennedy AR: Cancer Res. 1994, 54 (7 Suppl): 1999s-2005s)。

本発明者らはc-mycによって発現が上昇する遺伝子をcDNA マイクロアレイによって探索した。その結果、本特許事項で扱っている新規がん関連遺伝子を同定した。c-Myc蛋白質はこの遺伝子の発現を調節するプロモーター部分に結合し、この遺伝子の発現を直接上昇することがわかった (Tsuneoka, M., et al.: J Biol Chem 2002, 277:35450-35459)。白血病細胞株HL 60はTPA (ホルボル2-ミリステート13-アセテート (phorbol 2-myristate 13-acetate)) で処理することにより、c-myc発現が減少し増殖しなくなることが分かっている。そこで、未処理あるいは、TPAで処理した白血病細胞株HL 60の細胞抽出液を、かかるがん関連遺伝子がコードするタンパク質に特異性を有するポリクローナル抗体を作製し検討したところ、このタンパク質の発現がTPAにより減少することがわかった (Tsuneoka, M., et al.: J Biol Chem 2002, 277:35450-35459)。

なお、このタンパク質は、後で説明するように、特異的な抗体で間接免疫蛍光染色することによって可視化したところ、細胞内の核中に局在していることが見出されたことから、分子量53 kDaを有するmyc-induced nuclear antigenに因んで、このタンパク質をMina 53と命名するとともに、この遺伝子をmina 53と指称する。

したがって、上記先行技術による知見に基づいて、タンパク質Mina 53に対する抗Mina 53モノクローナル抗体を利用して、c-myc遺伝子によって調節されるこのがん関連遺伝子mina 53ならびにそのタンパク質Mina 53の機能的情報ならびに発現パターンを調べることは、c-myc遺伝子による発がん機構を解明するのに大いに役立つものと、本発明者らは考えている。

そこで、本発明者は、がん遺伝子mycの機能を説明するために、Myc標的遺伝子を同定すべく鋭意検討・研究した結果、そのタンパク質Mina 53に対する抗Mina 53モノクローナル抗体 (以下、

「抗Mina53モノクローナル抗体」ともいう)を作製することに成功した。また、本発明者は、その抗Mina53モノクローナル抗体を利用して、正常な大腸組織に比べて、大腸がん細胞においてタンパク質Mina53の発現が増加することを見出すとともに、このタンパク質Mina53の発現が、大腸がんにおける初期事象であり、特異的な特性であることを示した。更に、Mina53が大腸がん発生においてある種の役割を果たしている蓋然性を示唆していることも見出した。これらの結果から、ヒトタンパク質Mina53が、特に大腸がんに対するマーカーとして使用することができ、かつ大腸がん疾患を処置するための標的として開発できる可能性があることを見出した。さらに、食道がんに対してもマーカーとして使用することができ、かつ食道がん疾患を処置するための標的として開発できる可能性があることを見出してこの発明を完成した。

発明の開示

この発明は、がん遺伝子mycの機能を説明することができるMy c標的遺伝子であるヒト、マウスならびにラットmina53遺伝子およびヒト、マウスならびにラットのタンパク質Mina53を提供することを目的としている。

この発明は、mina53遺伝子をコードしているプラスミドならびにレポータープラスミドを提供することを別の目的としている。

この発明の更に別の目的は、かかる新規なMy c標的遺伝子によってがん細胞の増殖抑制をする方法を提供することである。

また、この発明は、mina53遺伝子またはヒトタンパク質Mina53もしくはそのフラグメントを抗原として得られる抗体を提供することを更に別の目的としている。

更に、この発明は、タンパク質Mina53に対して特異性を有するモノクローナル抗体(以下、「抗Mina53モノクローナル抗体」ともいう)を提供することを目的としている。

この発明のまた別の目的は、抗Mina53モノクローナル抗体を用いてタンパク質Mina53をがん細胞またはがん組織中で検出することからなるタンパク質Mina53の検出方法を提供することである。

この発明は、抗Mina53モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Mina53を染色することからなるタンパク質Mina53の染色方法を提供することを更に別の目的としている。

それらに加えて、この発明は、抗Mina53モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織

中に発現したタンパク質Mina53を染色することによってがんを診断することからなるがんの診断方法を提供することを別の目的としている。

これらの上記目的を達成するために、この発明は、新規なMy c標的遺伝子であるがん関連遺伝子を提供する。

この発明の態様の1つとして、この発明は、がん遺伝子my cによって直接発現調節を受けるとともに、配列表の配列番号1に示す塩基配列ならびにアミノ酸配列を有し、かつ、分子量5万3千(53 kDa)の核タンパク質をコードしているがん関連遺伝子mina53を提供する。また、この発明は、その1つの好ましい態様として、がん細胞の増殖に関連していて、かつ、がん組織において特異的に発現が上昇するがん関連遺伝子mina53を提供する。この発明の別の好ましい態様として、分子量53 kDaを有するタンパク質をコードしているがん関連遺伝子mina53が提供される。更に、この発明は、その好ましい別の態様として、核酸および核小体に局在していて、かつ、その発現がc-myc遺伝子によって誘発されるところのがん関連遺伝子mina53を提供している。

更に、この発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する細胞増殖作用を有するヒトタンパク質Mina53を提供する。

したがって、これらの諸機能を利用して、この発明に係るmina53遺伝子ならびにそのタンパク質であるMina53タンパク質は後述するように様々な有用な応用ができる。

この発明はまた、配列番号2で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子mina53または配列番号3で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子mina53を提供する。この発明による配列番号2で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子mina53および配列番号3で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子mina53は、その細胞増殖作用を調べるのに有用である。

この発明の別の態様として、この発明に係るがん関連遺伝子mina53をコードしているプラスミドが提供される。この発明はまた、その更に別の態様として、mina53ゲノミックDNAフラグメントを有するレポータープラスミドを提供している。

また、この発明は、その更に別の態様として、がん関連遺伝子mina53の発現を調節する方法を提供している。

更に、この発明の別の態様として、Mina53タンパク質に対する抗体が提供される。この発明に係る抗体は、例えば、がんの診断やがんの治療に利用することができるとともに、がん細胞などの正常でない細胞の診断や、細胞の状態の診断などにも利用することができる。

つまり、この発明は、タンパク質Mina 53、特にヒトタンパク質Mina 53に対して特異性を有する抗Mina 53モノクローナル抗体を提供している。

この発明はまた、その更に別の態様として、抗Mina 53モノクローナル抗体を用いてタンパク質Mina 53をがん細胞またはがん組織中に検出することからなるタンパク質Mina 53の検出方法（を提供している。

この発明のより好ましい態様として、タンパク質Mina 53を、大腸がん細胞または大腸がん組織中に検出することからなるタンパク質Mina 53の検出方法が提供される。

また、この発明は、その更に別の態様として、抗Mina 53モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Mina 53を染色することからなるタンパク質Mina 53の染色方法を提供する。更に、この発明は、より好ましい態様として、抗Mina 53モノクローナル抗体を用いて、大腸がん細胞または大腸がん組織中、食道がん細胞または食道がん組織中に発現したタンパク質Mina 53を染色するタンパク質Mina 53の染色方法を提供している。

この発明の更に別の態様として、この発明は、抗Mina 53モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Mina 53を染色することによってがんを診断することからなるがんの診断方法を提供している。この発明はまた、その好ましい態様として、抗Mina 53モノクローナル抗体を用いてタンパク質Mina 53を染色することによって大腸がん、食道がんの診断をする方法を提供している。

この発明のその他の目的、特長ならびに利点は、本明細書の下記の記載から明白となるものと理解できる。

図面の簡単な説明

図1は、この発明に係るヒトmina 53遺伝子の構造を示す図である。図1Aはヒトmina 53遺伝子のゲノミック構成を示す図であり、図1Bはレポータープラスミドを示す図であり、図1CはT98Gmycer-2細胞を使用したトランジェント発現アッセイの結果を示す図である。

図2はmina 53 mRNAの発現レベルを示す図である。図2Aはmina 53 mRNAの発現レベルがT98G細胞中のc-myc発現レベルと関連していることを示す図であり、図2Bはヒト前骨髄性白血病HL60細胞におけるmina 53 mRNAの発現レベルの低下とc-myc mRNAの消滅との

関係を示す図であり、図2CはMy c ERタンパク質を発現するT98G細胞 (T98Gmycer-2 細胞) におけるm i n a 5 3 mRNAの発現誘導を示す図である。

図3はM i n a 5 3のウエスタンブロッティング分析結果を示す図である。図3A左はMy cの活性化によるM i n a 5 3タンパク質の発現上昇を説明する図であり、図3A右はTPAによりMy c発現を減少させたときのc-My cタンパク質およびM i n a 5 3タンパク質の発現減少を説明する図であり、図3Bはラット細胞にヒトc-My cあるいは遺伝子発現上昇能を失った変異体c-My cを発現させたときのM i n a 5 3タンパク質の発現変化 (My cによる発現上昇) を示す図である。

図4はHL60細胞を使用したクロマチン免疫沈降実験結果を示す図である。

図5はRNA干渉によるM i n a 5 3タンパク質発現の減少とその細胞増殖に及ぼす効果を示す図である。図5AはRNA干渉によるM i n a 5 3タンパク質発現の減少を示す図であり、図5BはRNA干渉によりM i n a 5 3タンパク質発現が減少した細胞の細胞増殖を示す図である。図中、黒丸印はヒトm i n a 5 3に特異的なs i RNA二本鎖を導入した細胞の様子を示す。黒三角印はラットm i n a 5 3に特異的なs i RNA二本鎖を導入した細胞の様子を示す。白丸印はコントロールs i RNA二本鎖を導入した細胞の様子を示す。

図6Aは、抗M i n a 5 3モノクローナル抗体を用いたタンパク質M i n a 5 3のウエスタンブロッティング分析結果を示す図であり、図6Bは細胞内局在の状態を示す図である。図7は、大腸がん組織におけるタンパク質M i n a 5 3とK i - 6 7との免疫組織化学的染色血かを示す図である。図7Aは中分化腫瘍を含む切片のHE染色を示す図である。図7Bは、図7Aでの連続切片を示す図であり、抗M i n a 5 3モノクローナル抗体によって染色することにより、がん領域におけるM i n a 5 3の発現上昇を示している。また、隣接非腫瘍組織はほとんど染色されなかったことを示している。図7Cは抗K i - 6 7抗体によって染色した図7Aでの連続切片を示す図である。図7Dは一次抗体を使用していない図7Aにおけるコントロールとしての切片を示す図である。図7EはM i n a 5 3の特徴的核局在を示している図7Bに示す切片の拡大図である。図7Fは抗M i n a 5 3モノクローナル抗体による低分化腫瘍の染色を示す図である。図中、スケールは、300 μ m (図7A-D)、50 μ m (図7E)および75 μ m (図7F) である。

図8は、浸潤および転移している腫瘍におけるM i n a 5 3の免疫組織化学的発現を示す図である。図8Aは、抗M i n a 5 3モノクローナル抗体によって染色した上皮下のリンパ管に侵入したがん細胞を示している。図8Bは、抗M i n a 5 3モノクローナル抗体で染色した大腸深層にあるリンパ管中のがん細胞

胞を示している。図8Cは深部に浸潤している腫瘍細胞を染色した図である。図8Dは、抗Mina53モノクローナル抗体によって染色した繊維性基質中の腫瘍細胞を示している。スケールは、75 μ m (図8Aおよび図8D)、150 μ m (図8B)、300 μ m (図8C)である。

図9は、がん性、腺腫様ならびに非腫瘍性大腸組織の連続切片を抗Mina53モノクローナル抗体(左側)と抗Ki-67クローナル抗体(右側)で染色した場合の染色パターンの比較を示す図である。図9Aは、高分化腫瘍におけるMina53の染色をKi-67の染色(図9B)と比較した図を示す。図9Cは、腺腫におけるMina53の染色を、Ki-67を染色した図9Dと比較した図を示す。図9Eは、正常腺窩における上皮細胞のMina53に対する染色を、Ki-67を染色した図9Fと比較した図を示す。図9Gは、リンパ濾胞の胚中心におけるMina53の染色を、Ki-67を染色した図9Hと比較した図を示す。スケールは、75 μ m (図9A-F)と、150 μ m (図9Gと図9H)である。

図10は、リコンビナントタンパク質Mina53の定量線を示すグラフである。

図11は、ヒト血液中のタンパク質Mina53の定量を示すグラフである。

図12は、Mina53またはKi-67の発現と累積生存率を示すグラフである。(A)はMina53の発現と累積生存率との関係を示し、(B)はKi-67の発現と累積生存率との関係を示す。

図13は、食道がん組織に対するMina53とKi-67との発現度合いの比較を示すプロット図である。

発明を実施するための最良の形態

この発明に係るがん関連遺伝子mina53のcDNA配列を含むヒトゲノミックDNA配列はHTGS (GenBankAcc: AC026100, AC073245, AC024892)で検索することができる。なお、イントロン2(エクソン2とエクソン3との間)の長さはGenBankのデータ中で異なっているので、エクソン2とエクソン3の配列に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRで増幅し、その長さを5.2kbであることを決定した。

この発明に係るがん関連遺伝子mina53は配列表の配列番号1で示される塩基配列ならびにアミノ酸配列を有する。更に詳細には、図1に示すように、この発明のがん関連遺伝子mina53のうち、ヒトmina53遺伝子は12個のエクソンから構成され、最上流側に2個のエクソン1aとエクソン1bとは2個の転写開始部位として存在し、エクソン2に翻訳開始部位が存在するとともに、最後のエクソン10に停止コドン(TAG)が存在している。また、エクソン1bは、エクソン1aの0.25kb下流

に存在する。更に、主 cDNA の中央部、すなわちエクソン 5 とエクソン 6 との間に挿入された 101 bp の配列がエクソン 5' として存在している cDNA もある。464 個のアミノ酸 (297 Q を欠失している) をコードする cDNA は、エクソン 7 の最初の 3 bp を欠失している。UCSC Genome Browser のマッピングデータは、*mina53* 遺伝子が第 3 番染色体 (3q12.1) にマップされている。

また、この発明に係るがん関連遺伝子 *mina53* は、その発現ががん遺伝子 *c-myc* によって直接誘発され、また分子量 53 kDa を有するタンパク質をコードしていて、そのタンパク質は核質および核小体に存在している。更に、*mina53* の発現を特異的に阻害すると、細胞増殖が著しく抑制される。

この発明に係る新規な遺伝子 *mina53* は cDNA マイクロアレイ手法を使用して同定することができる。使用できる cDNA マイクロアレイ法としては、DNA チップ (cDNA マイクロアレイ) などの当該技術分野において慣用されている種々の手法を使用することができる。例えば、未処理の T98G mycer-2 細胞 (後述する) と、エストロゲンの誘導体 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) で 20 時間処理した同細胞から全 RNA を単離することができる。ポリ (A+) RNA は回収し、市販の DNA チップを用いて示差ディスプレイに付することができる。DNA チップには、発現配列タグ (EST: Expression Sequence Tagged) クローンを含む約 9 千種類もしくはそれ以上の cDNA をプレートすることができる。当然ながら、この発明はかかる技術に一切限定されるものではなく、当該技術において使用できる技術であればいずれの技術であっても使用することができる。

この発明において使用する *c-myc* をコードするプラスミドは、当該分野においては慣用されている手法によって作製することができる。使用するプラスミドにしても種々のプラスミドが市販されていて、目的に応じて適宜選択することができる。この発明において使用する *c-myc* をコードするプラスミドとしては、例えば、ヒト *c-myc* を CMV プロモーターによって発現誘導する *Pc-myc/CDM8* (Tsuneoka, M. et al. (1997) *Oncogene* 14, 2301-2311) あるいはそれを、*PstI* で消化し、自己ライゲートして作製された活性化ドメインが欠如している変異型 *c-Myc* タンパク質をコードする *pc-myc(d41-178)/CDM8*, *pTc-mycer/BS* の *BstXI-KpnI* フラグメントを、*pCAGGS* 哺乳動物発現ベクターの *EcoRI* フラグメント中に挿入し、*c-mycer* をチキン-アクチンと CMV プロモーターとから構成されたキメラプロモーター下に挿入して作製された *pc-mycer/CAGGS* などを使用することができる。

この発明に係る *mina53* をコードするプラスミドも同様に当該分野においては慣用されている手法によって作製することができる。使用するプラスミドにしても同様に種々のプラスミドが市販されていて、目的に応じて適宜選択することができる。

例えば、ヒト *mina53* に対する cDNA を、ヒト赤血球白血病細胞 (HEL) ライブラリーからの 5' -GAAGCTTATGCCAAAGAAAGCAAAGCCTACAGG-3' (開始コドンのメチオニンの直前に HindIII 部位を追加) と、5' -TGAATTCATCCTCTCCTCGGCTCAGGTCTT-3' をプライマーとして使用して PCR によって増幅し、増幅したフラグメントを特定のベクター中にクローン化して、それぞれ 465 個ならびに 464 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする pT/hmina53 (465) ならびに pT/hmina53 (464) とを作製することができる。この pT/hmina53 (465) の HindIII-SalI フラグメントから pEGFP/hmina53 (465) (GFP-Mina53 融合タンパク質を合成する) を作製することができる。また、HindIII と NotI とで消化した pT/hmina53 (465) の HindIII-NotI フラグメントから phmina53/Rc/CMV を作製することができる。更に、ヒト *mina53* をコードする DNA フラグメントを、pEGFP/hmina53 (465) からの 5' -GCCATGCCATGGCAAAGAAAGCAAAGCCTAC-3' (NcoI 部位を追加) と、5' -GGCATGCCATGGCTAGACTACTTGAATTAAAC-3' (NcoI 部位を追加) とをプライマーとして用いて PCR で増幅し、増幅したフラグメントを、NcoI で消化した *E. coli* 発現ベクター pET に挿入して、pET/hmina53 を作製することができる。更に、pEGFP/hmina53 (465) の XhoI-SalI フラグメントをベクター) 中に挿入して、pGEX-hmina53 (GST-Mina53 融合タンパク質) を作製することもできる。

また、この発明では、*mina53* 遺伝子のプロモータ活性を調べるために、その特定部位を含むヒト *mina53* ゲノミック DNA フラグメントをルシフェラーゼ (luciferase) cDNA に結合して、常法によりレポータープラスミドを構築することができる。DNA フラグメントがプロモータ活性を有していることは T98G 細胞中でのトランジェント発現アッセイによって調べることができる。

この発明によって、c-My c が *mina53* の発現を直接調節していることは明らかである。血清飢餓状態におかれた T98G 細胞が血清で活性化されたとき、c-myc mRNA のレベルが上昇し、その後続いて *mina53* が上昇する。HL60 細胞中で TPA による c-myc の発現が低下すると、*mina53* mRNA ならびにタンパク質の発現も低下する。ラット繊維芽細胞株 3Y1 中で、転写活性化ドメインを欠損した変異型 c-My c ではなく、野生型 c-My c が高発現すると、*mina53* の発現が

上昇する。c-My cタンパク質がc-My c ERキメラタンパク質中で活性化されたときに、m i n a 5 3 mRNAとタンパク質の発現が活性化される。c-My c ERの活性化によるm i n a 5 3 mRNAの誘導はタンパク質合成インヒビターであるシクロヘキサミドの存在下でも維持される。トランジェント発現アッセイにおいて、ヒトm i n a 5 3ゲノミックDNAフラグメントから構築されたレポータープラスミドからの発現は、c-My c ERの活性化によって上昇した。レポータープラスミド中の予測My c結合部位 (E-ボックス1: CACGTGエレメント) が破壊されたときには、c-m y cによるレポーター遺伝子発現の刺激上昇は起こらない。一方のCACGTGエレメント (E-ボックス1) が突然変異してもほとんど効果を有していないのに対して、他方のCACGTGエレメント (E-ボックス2) が突然変異するとc-My cによるプロモーター活性上昇が著しく低下することは、c-My cが特異的なCACGTGエレメントを介してm i n a 5 3の発現を活性化させることを示唆している。c-My cタンパク質は、増殖期のHL 6 0において、インビボでm i n a 5 3遺伝子の上記CACGTGエレメントが存在するm i n a 5 3ゲノミックDNAに結合する。ただし、TPAによって処理されたHL 6 0細胞では、c-My cタンパク質は、m i n a 5 3ゲノミックDNAに結合しない。これらの結果はc-My cがm i n a 5 3の発現を直接誘発していることを示している。

この発明に係る新規遺伝子m i n a 5 3は細胞増殖の調節を行う機能を有している。ヒトと啮歯動物との間にM i n a 5 3のアミノ酸配列が高率に保存されていることは、このタンパク質が哺乳動物において重要な役割を果たしていることを示唆している。m i n a 5 3の発現は細胞増殖と深く関係していて、細胞増殖に対するm i n a 5 3の役割を示している。M i n a 5 3の生物学的機能を調べるために、新しい手法、つまりスモール・インターフェアランスRNA (s i RNA) 手法を、m i n a 5 3の発現を特異的に阻止するために適用したところ、ヒトならびにラットの細胞中でM i n a 5 3タンパク質の発現がヒトならびにラットm i n a 5 3各々に特異的なs i RNA二本鎖によってだけ特異的に減少することによって特異的な阻害が明白に示された。他方、M i n a 5 3タンパク質の発現は、コントロールs i RNA (ヒトm i n a 5 3に対する反転配列) または使用した細胞とは異なる動物のm i n a 5 3に対する二本鎖によっては、特異的に減少しなかった。M i n a 5 3タンパク質の発現が減少したとき、細胞増殖が著しく阻害されることが、ヒトならびにラットの細胞において観察された。これらの結果は哺乳動物の細胞増殖におけるm i n a 5 3の重要性を示している。

c-m y c遺伝子の発現を段階的にゼロまで低下させたマウスを使用したインビボでの研究によって、c-m y c遺伝子は、そのc-My cレベルが低下すると多臓器形成不全 (細胞数を減少する) による体

重低下を引き起こすという働きを有していることが示されている。My c 活性は、マウスにおける細胞周期を再開する活性化T細胞と繊維芽細胞の細胞分裂する細胞との割合を決定する。最近のタイムラプス (time-lapse) 顕微鏡によるインビボでの研究によっても、my c 遺伝子は、細胞分裂を調節して、細胞周期に入るかもしくは細胞周期から出るかを調節していることが示されている。また、細胞周期の進行に直接関与しているいくつかの遺伝子、例えば、サイクリンD 1、サイクリンD 2、I d 2などがMy c 標的遺伝子として同定され、これらと一致した結果を示している。これらの遺伝子の一つを欠失したマウスは、c-my cを欠失したマウスと比較して、より緩やかな結果を示すのに対して、その機能を有するc-my c 遺伝子を完全に欠損した細胞に、発現遺伝子ライブラリーを導入しても、c-my cとN-my cとを繰り返し同定するだけで、正常な増殖を再確立する遺伝子を同定することはできなかった。これらの結果は、my c 遺伝子が、単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子を制御して細胞周期を調節していることを示唆している。更に、この発見によって、mina 53がc-My c標的遺伝子の一つであり、細胞増殖を調節していることが示されている。したがって、Mina 53タンパク質は、サイクリンD 1、サイクリンD 2、I d 2などのように細胞周期調節因子と直接相互作用することにより機能している可能性が考えられる。最近の研究では、核小体は真核生物細胞周期の調節に関与しているある種のタンパク質にとっては監獄の様なものとして機能していることが示唆されている。また、タンパク質が核小体中に封鎖封入されることは、そのタンパク質が細胞の別の領域にある標的に到達することを防止しているものと考えられる。

Mina 53タンパク質は、核に存在し、そのなかでも核小体中に集中している。核小体中にMina 53が局在していることはMina 53タンパク質の活性調節の1つの形態を示しているのかもしれない。

ショウジョウバエ (*Drosophila*) において、そのMy c (dMy c) の欠失が細胞生育 (細胞質量の蓄積) を低下させ、細胞サイズを縮小するのに対し、dMy cの過剰産生が生育割合ならびに細胞サイズを増加することが示されている。このことは、dMy cが細胞生育に関与する遺伝子を調節することを示唆している。My cの発現が増加し細胞サイズが大きくなることは哺乳類においても観察されている。例えば、免疫グロブリン重鎖エンハンサーのコントロール下でc-my cを発現するトランスジェニックマウスでは、Bリンパ球細胞の発達の全ての段階において正常なBリンパ球の細胞サイズを増加させる。この増加はタンパク質合成の増加と関連している。また、リボソーム生合成は、細胞増殖にとって必須であることから、核小体は1960年代から「リボソームファクトリー」であるといわれている。最近の報告では、my cが、リボソーム生合成の機能を有する大きなセット多数の遺伝子の発現を促進することが示

唆されていることもあわせて考えると、Mina 53が核小体中に局在しているということは、mina 53がリボソーム生合成において必須の役割を果たしている可能性を示唆している。

また、核小体がある種のmRNAの加工もしくは核外への移送、シグナル認識粒子RNAやテロメラーヌRNAの生合成、スプライセオソームの小さな核RNAの1種の加工などを含む多くの他の側面に関与していることが示されている。これらの機能はまた細胞増殖にとって必須であると思われる。したがって、Mina 53はこれらの機能の一つに対して役割を果たしているのかも知れない。

しかしながら、Mina 53においては、その機能が実験的に示された既知のドメインは見出されていない。ところが、Mina 53のアミノ酸配列128-271番は、配列類似性に基づいて最近同定されたドメインJmj Cのアミノ酸配列に良く整合している。Jmj Cドメインはクッピンフォールド(cupin fold)と呼ばれる構造を有する金属含有酵素に見られるが、DNA-もしくはクロマチン-結合ドメインと一緒にしばしば見出される。このことから、Jmj Cドメイン含有タンパク質は、クロマチンの構築を調節する酵素ではないかと考えられている。また、このドメインにおけるヒト、ラット、マウスのMina 53の87%は同じであり、全体の配列でも72%~75%が同じである。このことはこのドメインの機能的重要性を示唆している。したがって、Mina 53はクロマチン再構築を調節し、種々の遺伝子発現のパターンに著しく影響を及ぼす可能性を持っているものと考えられる。

以上述べたように、mina 53と細胞増殖との関係が明らかであることから、mina 53はmycの重要な標的であると考えられる。

次に、この発明の別の態様に係るタンパク質Mina 53に対する抗Mina 53モノクローナル抗体(抗Mina 53モノクローナル抗体)について更に詳細に説明する。

この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体は、大腸がん、肉腫、舌がん、脳腫瘍などのがん細胞中のタンパク質Mina 53を検出することができ、かつ、高感度で染色することができる。従って、この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体などの特異的抗体や、mina 53遺伝子を含む配列を有するRNA、DNAなどを利用することによって、Mina 53タンパク質や、Mina 53をコードするmRNAを組織中で検出し、がん細胞などの正常でない細胞を検出することもできる。Mina 53タンパク質の発現量は、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのMina 53タンパク質に結合する物質を利用して、例えば、ELISA法、ウェスタンブロッティング法などの手法によって測定することができる。また、細胞の状態は、例えば、mina 53遺伝子を含む配列を有するRNA、DNAなどを利用して、ノーザンブロッティング法、RNaseプロテクション法、RT-PCR法、cDNA

マイクロアレイ法などの各種測定法によって測定することもできる。更に、Mina 53タンパク質に対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などの抗体を利用することにより、当該技術分野において慣用されているELISA法などの手法により体内に存在するがん細胞などの正常状態にない細胞の存在の有無やその量を推定もしくは測定して診断を下すことも可能である。

ここに、この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体は、当該技術分野に慣用されている常法に従って作製することができる。つまり、本発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体は、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法や電気的融合法などの融合方法、センダイウイルスやエプシュタインバー（Epstein-Barr）ウイルス等を用いた方法、遺伝子組み換えによる組み換え体や発がんプロモーター等による形質転換体を用いた方法などによっても調製することができる（Koehler, G., Milstein, C.: Nature 256, 495 (1975)）。特に、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法によるハイブリドーマの樹立が好適である。

ここで、この発明において好適に使用することができるポリエチレングリコールを例にして細胞融合法によるハイブリドーマの樹立についてより詳細に説明する。

この発明において、抗原は、公知の方法により調製することができ、例えば、免疫原となるリコンビナントヒトタンパク質Mina 53を、大腸菌などを利用して作製し、得られた精製タンパク質を必要に応じてアジュバントなどと混合することにより調製することができる。

次に、調製した抗原を免疫動物に対して免疫する。抗Mina 53モノクローナル抗体を作製するためには、融合に用いる骨髓腫細胞との相性の問題により、免疫動物としては、近交系動物が確立しているマウスやラットを用いるのが好ましいが、例えば、牛、馬、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなども使用することができる。免疫動物への免疫方法としては、一般的には、皮下注射、筋肉注射、腹腔内注射などの注射によって行うことができる。抗原の投与量は、所望の抗体価が得られ、かつ免疫動物に対して悪影響を与えない量であれば、適宜選択して決定することができる。なお、免疫に際しては、免疫応答を促進するために、免疫原を、必要に応じて、例えば、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウム等のアジュバントと併用することもできる。特に、合成ペプチドを免疫原として使用する場合には、BSA (Bovine Serum Albumin)、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine) 等のキャリアタンパク質と架橋剤で結合したものをを使用することもできる。

この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製は、常法に従って行うことができる。すなわち、免疫動物に対する最終免疫後、抗体価の上昇を確認して、免疫動物から脾

臓を取り出して脾細胞を得る。この脾細胞を、免疫に用いた同種動物由来の継代培養した骨髓腫細胞と、融合促進剤の存在下において緩衝液中で融合させてハイブリドーマを作製する。使用できる骨髓腫細胞としては、公知の骨髓腫細胞、例えば、マウス由来のSP2/O-Ag14, P3-NS1-1-Ag4-1, MPC11-45, 6. TG1. 7など、ラット由来の210. RCY. Ag1. 2. 3など；ヒト由来のSKO-007, GM15006TG-A12などが挙げられ、適宜選択して使用することができる。また、脾細胞と骨髓腫細胞との細胞数の割合は、通常約10対1～約1対1の範囲内、好ましくは約4対1～約1.5対1の範囲内となるような割合がよい。

融合促進剤としては、ポリエチレングリコールや、センダイウイルス (HVJ) などが使用できるが、取り扱い易さ、融合効率などの観点から、ポリエチレングリコールを使用するのが好ましく、ポリエチレングリコールのうちでも平均分子量が約1,000～5,000の範囲内にあるものが好ましい。また、このポリエチレングリコールの緩衝液中での濃度は、約40～60重量%の範囲内にあるのが好ましい。また、融合効率を向上させるために、培地には、ジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもできる。

この発明による上記した脾細胞と骨髓腫細胞との細胞融合は、電気融合法などの常法に従って行うことができ、通常、両細胞を、細胞融合剤を添加した動物細胞用培地または平衡塩類溶液を、例えば、37℃の温度で約2分間攪拌下で培養するなどの方法によって行うことができる。使用する動物細胞用培地としては、例えば、RPMI-1640培地、ハンクスMEM培地 (Hanks' Minimum Essential Medium)、イーグルMEM培地 (Eagle's Minimum Essential Medium) などが挙げられ、平衡塩類溶液としては、例えば、ハンクス液 (Hanks' balanced salts solution)、アール液 (Earle's balanced salts solution) などが挙げられる。

上記のようにして得られた細胞混合物から、タンパク質Mina53に特異性を有する抗Mina53モノクローナル抗体を産生する能力を有するハイブリドーマは、常法に従って、次のようにして選別することができる。つまり、かかるハイブリドーマの選別は、まず、細胞融合操作終了後、得られた細胞混合物から脾細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合したハイブリドーマを分離し、続いてその分離したハイブリドーマから、タンパク質Mina53に対して特異性を有する抗体を産生する能力を有するハイブリドーマを選別することによって行うことができる。

更に具体的には、上記細胞融合操作により得られた細胞混合物からハイブリドーマの分離は、かかる細胞混合物を融合細胞のみが増殖できる培養条件下で培養することによって、所望のハイブリドーマを選択

的に増殖させることによって行うことができる。一般的には、該細胞混合物を、例えば、HAT培地（ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地）などの選別用培地で培養することによって、目的とするハイブリドーマを選択的に増殖することができる。HAT培地中での細胞混合物の濃度は、通常、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/ml の範囲となるように調整するのがよい。このHAT培地の培養は、通常、二酸化炭素を約5～8%含む空気中において約37℃の温度で約1～4週間静置下にて行うのがよい。

次に、上記のようにして分離したハイブリドーマから、そのハイブリドーマがMina 53に特異性を有する抗体を産生する能力を有するかどうかを判定して、ヒトタンパク質Mina 53に対して特異性を有する抗体を産生する能力を有するハイブリドーマを選別することができる。この判定は、例えば、RIA法、ELISA法、ブランク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー法などによって行うことができる。このようにして選別されたハイブリドーマを、例えば、限界希釈法によってクローニングすることにより、Mina 53に特異性を有する抗Mina 53モノクローナル抗体を産生する能力を有する増殖可能なハイブリドーマ株を作製することができる。

このようにして作製された抗Mina 53モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ヒトタンパク質Mina 53を認識することができ、通常の培地で継代培養することが可能であり、かつ、液体窒素中で長時間保存することもできる。

本発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体をかけるハイブリドーマから採取するには、このハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこのハイブリドーマに適合性が認められる動物、例えば、骨髄腫細胞が由来する動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いて得ることができる。

また、本発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体の精製は、上記のようにして得た免疫動物の抗血清や、ハイブリドーマの培養上清ならびに腹水より得られた抗体を、例えば、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の当該分野で通常行われている既知の精製方法によって行うことができる。

なお、インビトロで免疫細胞をヒトタンパク質Mina 53またはその一部の存在下で培養し、一定期間後に上記細胞融合手法を用いて、この免疫細胞と骨髄腫細胞とのハイブリドーマを調製し、抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることによって、本発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体を得ることもできる（Reading, C.L.: J. Immunol. Meth., 53, 261 (1982); Pardue, R.L., et al.: J. Cell Biol., 96, 1149 (1983)）。

この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体はがん細胞およびがん組織内においてヒトタンパク質Mina 53を発現することができる。

この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体は、白血病細胞株HL 60を用いたウェスタンブロッティングによって、分子質量53 kDaの単一バンドを認識することができる。また、この抗Mina 53モノクローナル抗体を用いた免疫ブロッティング分析によって、TPAで細胞処理をすると、53 kDaのバンドのシグナルが減少するが、これに対して、TPA処理によっては β -アクチンの発現は実質的には減少されないという特異的な減少が確認されている。

なお、本発明者らは、HL 60細胞を、抗Mina 53ポリクローナル抗体を用いてTPAで処理することによって、Mina 53の発現を減少させたことをすでに報告している (Tsuneoka, M., et al.: J Biol Chem 2002, 277:35450-35459)。また、HL 60細胞は、c-mycの発現レベルが減少されるTPAによって最終的に分化されることが報告されている (Hozumi, M.: Adv Cancer Res, 1983, 38: 121-169; Hickstein, D.D., et al.: J Biol Chem 1989, 264:21812-21817))。

更に、HeLa細胞中に発現させたグリーン蛍光タンパク質 (GFP) に細胞融合させたタンパク質を用いた別の実験においても、この抗Mina 53モノクローナル抗体が、内在性タンパク質Mina 53に加えて、新たな単一バンドを発生したことを確認している。

これらの結果は、この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体がタンパク質Mina 53を特異的に認識することを示している。

この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体は、大腸がん細胞株におけるヒトタンパク質Mina 53を検出することができる。例えば、3種類の増殖期の大腸がん細胞株、HT-29、WiDrおよびSW-620を用いた抗Mina 53モノクローナル抗体による免疫ブロッティング分析の結果、抗Mina 53モノクローナル抗体は、3種類すべての細胞株において53 kDaの単一バンドを認識することができた。このことは、これらの細胞株がタンパク質Mina 53を発現し、抗Mina 53モノクローナル抗体が、他のタンパク質と交差反応をせず、大腸がん細胞中のタンパク質Mina 53を特異的に認識していることを示している。

これらの細胞株におけるタンパク質Mina 53の発現レベルは、TPAによって実験的に減少させたHL 60細胞中のタンパク質Mina 53の発現レベルよりもより一層高かった。他方、上記3種類の大腸がん細胞株におけるアクチンレベルは、TPA処理したHL 60細胞のアクチンレベルよりも高くはなかった。これらの結果は、上記3種類の大腸がん細胞株が最終的に分化したHL 60細胞よりも比較的高

いレベルのタンパク質Mina 53を含んでいることを示唆している。

また、この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体と抗ヌクレオリンラビット抗体とを用いた二重細胞免疫蛍光染色によって、タンパク質Mina 53は、大腸がん細胞内に局在していることが確認されている。抗Mina 53モノクローナル抗体は、細胞SW-620内の核を特異的に染色するとともに、その核質内の核小体に、ヌクレオリンに対するシグナルと重複する強力な点状の染色を施している。その他の2種類の細胞株も同一の免疫蛍光染色パターンを示した。これらの結果は、タンパク質Mina 53が、本発明者らがHeLa細胞についてすでに示したものと同様に (Tsuneoka, M., et al., *ibid*)、核小体内核質中に凝縮した状態で核内に局在していることを示唆している。

更に、この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体は、がん細胞に加えて、がん組織、例えば、大腸がん組織内のタンパク質Mina 53を検出することができるとともに、大腸がんのいずれの組織病理学的等級において、つまり、十分に分化した腫瘍、中程度に分化した腫瘍およびあまり分化していない腫瘍においてもタンパク質Mina 53を検出することができる。

以下に、この発明を実施例によって更に説明をするが、下記実施例は、この発明を説明する目的のために例示的に記載するものであって、この発明を一切限定する意図で記載するものではない。

実施例1：

(c-mycをコードするプラスミド)

ヒトc-mycをCMVプロモーター下に導入したPc-myc/CDM8 (Tsuneoka, M. et al. (1997) *Oncogene* 14, 2301-2311) を用いた。またこのプラスミドを、PstIで消化し、自己ライゲートして、活性化ドメインが欠如している変異型c-My cタンパク質をコードするpc-myc (d41-178)/CDM8を作製した。pTc-mycer/BSの2 kbのBstXI-KpnIフラグメント (Klenow Enzymeで平滑化した) を、pCAGGS哺乳動物発現ベクターの5 kbのEcoRIフラグメント (Klenow Enzymeで平滑化し、E. coli アルカリホスファターゼによって脱リン酸化した) 中に挿入して、c-myc erがチキン-アクチンプロモーターとCMVプロモーターとから構成されたキメラプロモーター下に挿入したpc-myc er/CAGGSを作製した。

実施例2：

(mina 53をコードするプラスミド)

ヒトmina 53に対するcDNAを、ヒト赤血球白血病 (HEL) ライブラリからの5'-GAAGCTTATGCCAAAGAAAGCAAAGCCTACAGG-3' (開始コドンのメチオニンの直前

に HindIII 部位を追加) と、5'-TGAATTCATCCTCTCCTCGGCTCAGGTCTT-3' をプライマーとして使用してヒト赤白血病細胞 (HEL) ライブラリーから PCR によって増幅した。増幅した 1.4 kb のフラグメントを pGEM-T ベクター (プロメガ社製) 中にクローン化して、それぞれ 465 個ならびに 464 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする pT/hmina53(465) ならびに pT/hmina53(464) とを作製した。pT/hmina53(465) の 1.4 kb の HindIII-SalI フラグメントを、HindIII と SalI とで切断した pEGFP-CS (クロンテック社製) を用いて伸長してクローン化し、pEGFP/hmina53(465) を作製した。HindIII と NotI とで消化した pT/hmina53(465) の 1.4 kb の HindIII-NotI フラグメントを、pRc/CMV (Invitrogen) 中に挿入して、pmina53/Rc/CMV を作製した。ヒト min a 53 をコードする DNA フラグメントを、pEGFP/hmina53(465) からの 5'-GCCATGCCATGGCAAAGAAAGCAAAGCCTAC-3' (NcoI 部位を追加) と、5'-GGCATGCCATGGCTAGACTACTTGAATTAAAC-3' (NcoI 部位を追加) とをプライマーとして用いて、ヒト min a 53 をコードする DNA フラグメントを、pEGFP/hmina53(465) から PCR で増幅し、増幅した 1.4 kb フラグメントを、E. coli 発現ベクター pET11d (Novagen) (NcoI で切断し、E. coli アルカリホスファターゼで脱リン酸化した) を用いて伸長に挿入し、pET/hmina53 を作製した。pEGFP/hmina53(465) の 1.4 kb の XhoI-SalI フラグメント (Klenow Enzyme で平滑化した) を、pGEX-3X (Pharmacia) (EcoRI で消化して、Klenow Enzyme で平滑化し、E. coli アルカリホスファターゼで脱リン酸化した) 中に挿入して、pGEX-hmina53 を作製した。

実施例 3 :

(min a 53 のゲノミック DNA フラグメントを有するレポータープラスミド)

そのプロモーター領域からイントロン 1 に伸長しているヒト min a 53 遺伝子のゲノミック DNA フラグメントを、プライマーとして 5'-CGGGATCCTGAACGCGGAACACCGCCGGGTAGC-3' (BamHI 部位を追加) と、5'-CCCAAGCTTCCTCTTCCTCCCAGTCTATCCTTC-3' (HindIII 部位を追加) とを用いて、ヒト min a 53 遺伝子のプロモーター領域からイントロン 1 の一部までのゲノム DNA 断片を、ヒト末梢血由来の DNA を鋳型とし PCR で増幅した。その増幅した 0.8 kb のフラグメントを、BamHI と HindIII とで切断した後、BglII と HindIII とで切断した pGL3 (プロメガ社製) の 4.8 kb フラグメント中に挿入して、pMina(W)luci を作製した。pMina(W)luci を HindIII と PmaCI で切断し、Klenow Enzyme で平滑化し、自己連結し

て-pMina(dE)luci を作製した。つぎに、Gene Editor インビトロ (in vitro) 部位指向突然変異システム (プロメガ社製) を用いて、pMina(W)luci のE-ボックス部位に突然変異を導入し、その2個のE-ボックス (CACGTGエレメント) の一方もしくは両方をCACCTGに変異したpMina(mE1)luci と、pMina(mE2)luci と、pMina(mE1/2)luci とを作製した。

参考例1：

(その他のプラスミド)

アクチンプロモーターのコントロール下においてハイグロマイシン抵抗遺伝子を含有する pActHyg P ActHyg プラスミドは Dr. M. Nakanishi から贈与されたものである (Tsuneoka, M. et al. (1997) Oncogene 14, 2301-2311)。CMVプロモーターのコントロール下で Renilla reniformis luciferase 遺伝子を含有する pRL-CMV プラスミドは市販されているもの (プロメガ社製) を入手した。

実施例4：

(RNAの調製とノーザンブロット分析)

RNAは、DEPCで処理した市販のRNA調製液セット (ナカライテスク社製) を用いて、酸グアニジウム・チオシアネート・フェノール・クロロホルム抽出法によって細胞から単離した。抽出したRNAは、ホルムアルデヒド含有アガロースゲルを用いて電気泳動をし、ハイボンDN (アマシヤム社製) に転写し、³²Pで標識したcDNAプローブで検出した。プローブは、市販の Multiprime ラベリングキット (アマシヤム社製) を用いて [γ -³²P] dCTP で標識した。結果はBAS 200イメージ分析 (富士フィルム社製) を用いて定量した。

実施例5：

(プローブDNAの調製)

c-myc と、mina 53 と、CD18 とのDNAプローブは次のようにして調製した。

c-myc の調製：

ヒト c-myc cDNA を含有する p c-myc / CDM8 からの 1.6 kb の HindIII-XbaI フラグメントを調製した (Tsuneoka, M., et al.: (1997) Oncogene 14, 2301-2311)。

mina 53 の調製：

上記 pEGFP / hmina 53 (465) からの 5' -CAGAGCTGTCAACACCAGGT GGAAAGTTAC-3' と、5' -TGAATTCATCCTCTCCTCGGCTCAGGTCT

T-3' とをプライマーとして使用して、PCR法にて増幅して得られた442bpのフラグメントを使用した。

CD18の調製:

TPA 10 nM 中で24時間培養したHL60細胞から単離した全RNAからの5' -GTTTGCCACTGATGACGGCTTCCATTTC-3' と、5' -AACACGCACCTAACCTCACCAACCTCAA-3' とをプライマーとして使用して、RT-PCR法にて増幅して得られた1.8 kbのフラグメント。CD18 cDNAの配列は直接シーケンス法によって確認した。

実施例6:

5' -RACEおよびRT-PCRプロトコルについて説明する。

(ポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR))

各プライマー10 pmole と、EX Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) 1.2 U と、dNTP 200 μM とを含むEX Taq バッファ 50 μl を用いて増幅を行った。

(5' -RACE (Rapid Amplification of 5' cDNA Ends) 分析)

HEL細胞のポリ (A) +RNA (1 μg) から、逆転写反応、2重鎖cDNA合成およびアダプターライゲーションを、マラソン (Marathon) cDNA増幅キット (クロンテック社製) を用いて行った (Koda, Y. et al.: (1997) J. Biol. Chem. 272, 7501-7505)。第1PCRは、プライマーとして、mina53-RACE-1 (5' -GCAGTACTGTGAGGACAATGTGGTCTT-3') と、AP1プライマーとを使用して行った。温度プロファイルは、94℃で1分間の初期熱変性後、96℃での15秒間の熱変性工程、68℃での3分間のアニーリング工程と伸張工程とを1サイクルとして25サイクルの処理をした。上記第1RACE-PCR生産物を1000倍希釈した液1 μl をネストRACE-PCRのためのテンプレートとして使用した。ネストRACE-PCRは、mina53-RACE-2 (5' -CAACCAAGGAGCCAAAGTAACATTTC-3') と、AP2プライマーとを使用して行った。温度プロファイルは、94℃で1分間の初期熱変性後、96℃での15秒間の熱変性工程、68℃での4分間のアニーリング工程と伸張工程とを1サイクルとして25サイクルの処理をした。

(RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR))

HELもしくはRCN-9細胞もしくはマウスの胃の細胞の一本鎖cDNAを、市販のスーパーSCRIPT (Superscript) 一本鎖cDNA合成キット (Invitrogen) を用いて全RNA (1 μg) に対して合成した。得られた1重鎖cDNA 1 μl (全量 20 μl) をPCRの鋳型として使用した。増幅用の

RT-PCR用プライマーとしては、ヒトに対しては、*mina53*RT-F (5' -ACACCGGTGACGAGCGCACGGAAAG-3') と、*mina53*RT-R (5' -GCCTCTCATCTGTGGGGAAGTATTA-3') とを、ラットとマウスに対しては、ラット*mina53*RT-F (5' -TTTCCTCCCTACTTGTGAACAATGC-3') と、ラット*mina53*RT-R (5' -AATGATGCTCTTTAAAGGAGTTATTT-3') とを使用した。温度プロファイルは、98℃での15秒間の熱変性工程と、65℃での1分間のアニーリング工程と、72℃での2分30秒間の伸張工程を1サイクルとして35サイクルの処理をした。

実施例7：

(細胞培養)

ヒト膠芽腫細胞株T98G細胞を非必須アミノ酸と10%ウシ胎児血清(FCS)含有イーグル培地中で培養した。HeLa細胞、ラット繊維芽細胞株3Y1およびその誘導体を、10%FCS添加ダルベッコ補正イーグル培地中で培養した。ヒト前骨髄性白血病細胞HL60を、20%FCS添加RPMI1640培地中で培養した。ラット結腸がん細胞株RCN-9を、RIKEN細胞バンクから入手して、10%FCS添加RPMI1640培地中で培養した。Mycまたは活性化ドメインを欠損したc-Mycを発現する3Y1細胞を確立するために、20 μg の pc-myc/CDM8 もしくは pc-myc(d41-178)/CDM9 と、0.4 μg の pActHyg とを用いて、カルシウム-リン酸方法によって、細胞に遺伝子導入した(Chen, C.A., et al.: (1988) Biotechniques 6, 632-638)。得られた細胞は200 μg/ml のハイグロマイシンを含有する培地中で2週間培養した。個々のクローンを単離し、c-Myc もしくは変異型c-Mycタンパク質の発現を、抗c-Myc抗体を使用してウェスタンブロット分析法によって検出した。クローン3Y1MycAと3Y1MycB(c-Mycタンパク質を発現している)およびクローン3Y1Myc(dTAD)Aと3Y1Myc(dTAD)B(大部分の活性化ドメインを欠損している変異型c-Mycタンパク質を発現している)が確立された。c-Myc ERキメラタンパク質(T98Gmycer-2)を発現するT98G細胞を確立するために、20 μg の pc-mycer/CAGGS と、0.4 μg の pActHyg とを用いて、細胞を形質転換し、個々のクローン中のc-Myc ERの発現は上記のようにして検出し、T98Gmycer-2を確立した。

実施例8：

(DNAチップ(cDNAマイクロアレイ)を用いた示差ディスプレイ)

未処理のT98Gmycer-2細胞とOHTで20時間処理した細胞から全RNAを単離した。ポリ(A+)RNAを回収し、市販のDNAチップ(インサイト社製)を用いて示差ディスプレイに適用した。発現配

列タグ (E S T) クローンを含む約9千種類のcDNAをチップにプレートした (UniGEMHumanVVer. 2)。

実施例9：

(トランジェント発現アッセイ)

T98Gmycer-2 細胞を 10% FCS を追加した培地中で生育した。 3×10^4 個の細胞をディッシュ (12 ウェルプレート；ウェルの直径：22 mm) 中にプレートし、20～24時間培養した。1 μ g のレポータープラ スミドとインターナルマーカ―として 20 ng の pRL-CMV を FuGENE6 試薬 (ロッシュ・ダイアグノスティックス社製) を用いて細胞に導入した。レポーター遺伝子導入1日後、OHT (最終濃度が 0.2 μ M になるように) を添加してMy c ERキメラタンパク質を活性化して、更に17時間培養した。次いで、細胞を回収して、ファイアフライ・ルシフェラーゼ (firefly luciferase) ならびにレニラ・レニホルミス・ルシフェラーゼ (Renilla reniformis luciferase) の活性をデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ系 (dual-luciferase reporter assay system) (プロメガ社製) を用いて定量した。Renilla reniformis ルシフェラーゼ活性値を用いて試料間の遺伝子導入程度を標準化した後、活性化My c ERを有する細胞からの fireflyルシフェラーゼ活性を、My c ER活性化していない細胞からの活性に対する比率として表した。My c ERの活性化によらないOHTの効果を標準化するために、T98Gmycer-2 細胞からの値を、上記 T98Gmycer-2 細胞と同一方法で処理した T98G 親細胞からの値で割った値を求め、My c ERキメラタンパク質の活性化に対するレポーター遺伝子の反能性反応性とした。なお、値は4回実験をしてその平均値で表している。

実施例10：

(クロマチン免疫沈降)

クロマチン免疫沈降実験は、c-My c に対する抗体ならびにコントロール抗体を使用して行うとともに、抗体を使用しないコントロールも行った。この実験では、c-My c に対する抗体は2種類使用した。1つはc-My c のN-末端側半分と反応し、もう1つはC-末端側半分に主に結合するものである。アッセイは基本的にはすでに発表された方法に従って行った (Boyd, K.E., et al.: (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2529-2537)。免疫複合体は、非特異的な結合を妨げるように処理をしたプロテインAビーズ (50%容量/容量) 20 μ l を添加することによって回収した。上記文献記載のようにして、ビーズを洗浄し、DNAフラグメントを溶出し、溶出した溶液をフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈降させた。免疫沈降したDNAフラグメントはPCRによって検出した。使用したPCRプライマ

ーは、5'-GCCGGCGCTGTGGTTGCGGGACCTG-3'と、5'-TCCTCTTCC
TCCCAGTCTATCCTTC-3'であり、これらのプライマーを使用してヒト *mina53* 遺伝
子の転写開始部位の近くにE-ボックスを含む483bpのフラグメントを増幅する。別のプライマーと
しては、5'-TTACAGGTAAGCCCTCCAATGACC-3'と、5'-GCAAAGCTA
CCATTTAGGAACCC-3'とを使用して、第22番染色体中の検出可能な遺伝子を有しない領
域に位置している (Bouchard, C., et al.: (2001) *Genes & Dev* 15, 2042-2047) E-ボッ
クスにおけるゲノミック配列を増幅する。このE-ボックスは検出可能な遺伝子を有しないクロモソーム
中に位置している (Bouchard, C., et al.: (2001) *Genes & Dev* 15, 2042-2047)。

実施例11:

(抗体)

ヒト *mina53* の *Lys3* からカルボキシル基末端までの部分は、市販の *E. coli* BL21 (DE3)
(Novagen) 中で pET/hmina53 を用いて発現し、SDS-PAGEによって単離、精製した。この組
換えポリペプチドでラビットを免疫した。GST融合タンパク質GST-Mina53を *E. coli* JM109
中で pGEX-hmina53 を用いて発現し、グルタチオン・セファロース (Pharmacia) によって単離した。
組換えGST-Mina53ポリペプチドを結合したセファロース4Bを用いてラビットの血清から抗体
を上記文献に従って精製した。1個の抗c-My c抗体はすでに報告したものをを用いた。

参考例2:

その他の抗体は市販のものを使用した。その他の抗体としては、抗c-My c抗体 (N262) (サン
タクルス社製)、抗ヌクレオリンマウスモノクローナル抗体 (C23 (サンタクルス社製)、ヤギ抗ラビ
ットIgG-HRP抗体 (サンタクルス社製)、アレクサ488結合抗マウスIgG (モレキュラー・ブ
ローブ社) およびCy5結合抗ラビットIgG (ザイメッド・ラボラトリーズ社製) を使用した。

実施例12:

(ウェスタンブロット分析および間接免疫蛍光染色)

ウェスタンブロッティングは実質的には上記文献記載のとおりに行った (Tsuneoka, M., et al.:
(1988) *J. Biochem.* 104, 560-564)。細胞をトリプシン処理し、100 mM トリス (pH 6.8)、0.1
M DTT、20%グリセロールを含む3%SDS溶液中に回収し、4~20%ポリアクリルアミド上で分
離し、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) ミリポアメンブレン (ミリポア社製) に移行した。抗体
で処理した後、シグナルをECL強化化学発光法 (アマシャム・ファルマシア社製) を用いて検出した。

間接免疫蛍光法のために、6 ウエルプレートのカラスカバースリップ上で生育したHeLa細胞を-20℃で10分間メタノール中で固定した。抗Mina 5.3ラビット抗体と抗ヌクレオリンマウスモノクローナル抗体を添加し、37℃で120分間反応した。0.1%スキムミルクPBS懸濁液で3回洗浄した後、Alexa 488結合抗マウスIgGならびにCy 3結合抗ラビットIgGを添加し、37℃で120分間反応し、0.1%スキムミルクPBS懸濁液で3回洗浄した。最後に、細胞をイムノン (Immunon) (テルモ・シャンドン社製) 中に埋設し、蛍光顕微鏡で観察した。

実施例13:

(RNAの調製およびsiRNAの細胞中への導入)

21個のヌクレオチドからなるスモール・インターフェアリング (small interfering) RNA (siRNA) 二本鎖が、HeLa細胞を含む哺乳動物の細胞株中で遺伝子発現を特異的に抑制するとの報告が最近なされている (Elbashir, S. M., et al.: (2001) Nature 411, 494-498)。そこで、21個のヌクレオチドからなるsiRNAであって、ヒトMina 5.3ならびにラットMina 5.3 (19個のヌクレオチドのうち5個がヒトMina 5.3のそれとは異なる) に対して特異的なsiRNA二本鎖2重ラセンを常法にしたがって化学的に合成した。非特異的コントロールとして、ヒトMina 5.3 siRNAとは逆方向配列を有する二本鎖も同様に合成した。ヒトMina 5.3およびラットMina 5.3を標的とするsiRNA配列は、開始コドンの第1ヌクレオチドに対して位置45-63を使用し、3'末端に2つのデオキシチミジンを付加している。siRNAをアニールし、実質的には文献記載の方法と同じ方法で細胞に導入した (Elbashir, S.M., et al.: (2001) Nature 411, 494-498)。siRNA導入の24時間前に、指数関数的生育期の細胞をトリプシン処理し、12ウエルプレートにプレートした。siRNAは1ウエルあたりsiRNA 200 pmole と、市販のオリゴフェクタミン (Oligofectamine) (ライフテクノロジー社) とを用いて細胞に導入した。ただし、HeLa細胞は、無血清培地では20時間以上培養し、3Y1MycB細胞では同様に10時間培養し、siRNAを導入した。

実施例14: 抗ヒトMina 5.3モノクローナル抗体の作製

(抗原)

大腸菌を利用してリコンビナントヒトMina 5.3タンパク質を作製した。精製したタンパク質をMPL+TDM アジュバントシステム (シグマ社) と混合することにより感作用抗原溶液とした。

(免疫スケジュール)

生後8週から10週のマウス (Balb/c) の後ろ足のひらに0.1 ml (0.5 mg/ml、Mina 5.3タ

ンパク質) ずつ、合計一匹当たり 0.2 ml の上記抗原溶液を注射し1回の感作とした。初回の注射をしてから、3日後、6日後に同様の方法で抗原を注射した。14日後にアジュバントと混合しない抗原を上記と同量、同様の方法により注射しブースト (Boost) した。

(B細胞の回収)

最後の注射 (Boost) から4日後に後ろ足付け根のリンパ節を無菌的に取り出し、滅菌したスライドグラス2枚を使ってリンパ節組織を摺り潰して壊してB細胞を回収した。

(細胞融合)

回収したB細胞をマウスミエローマ細胞株 FO1 細胞と10:1の割合で混合した後、ポリエチレングリコール (PEG) 4000 を用いて両者を細胞融合した。

(ハイブリドーマの選択)

融合した細胞は96穴培養皿で培養した。培地は5%Briclone (大日本製薬)、20%牛胎児血清、HAT溶液を含むRPMI 1640培地を用い、B細胞と融合したマウスミエローマ細胞 (ハイブリドーマ) のみを選択的に生存させた。この時、ハイブリドーマ生育を助けるため融合していない胸腺細胞と共に培養した。

上記のようにして、4個のハイブリドーマを選別し、このうちの1つ (mouse-mouse hybridoma MT/HK-1) を、平成15年4月9日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) にFERM P-19298として寄託している。

実施例15: 抗Mina53モノクローナル抗体活性の測定法

精製したリコンビナントヒトタンパク質Mina53を10mM Tris (pH 8.0) 溶液に3~10 g/mlの濃度になるように調整し、得られた溶液0.1 mlをマイクロタイタープレートの各ウェル中に加え、3時間から1昼夜室温で放置した。その後、溶液を捨て、1%スキムミルクを含むPBS (phosphate buffered saline) 溶液を0.2 ml 加えて4℃で保存した (ブロッキング操作)。プレートは2時間から1週間以内に使用した。1%スキムミルク溶液を捨てた後、PBSでウェルを2回洗浄後、測定に供する溶液0.1 mlを加え、37℃で2時間あるいは4℃で1昼夜インキュベーションした。ウェルを3回PBSにより洗浄した後、西洋ワサビパーオキシダーゼを結合した抗マウスIgG溶液を0.1ml加え、37℃で2時間あるいは4℃で1昼夜インキュベーションした。その後、ウェルを3回PBSにより洗浄した後、パーオキシダーゼの基質であるo-PDA 溶液 (0.4 mg/ml o-フェニレンジアミンの0.1 M クエン酸塩溶液、0.2 M Na₂HPO₄, 0.005% H₂O₂) を0.1 ml 加え、室温で15分から30分間放置

した後、0.05 ml のオキサレート溶液を加えて反応を停止した。450 nm での吸収を測定することにより、パーオキシダーゼ活性を測定した。

上記ハイブリドーマを培養した培地中の抗Mina 53抗体活性の測定は、培養を始めてから14日後と21日後に培養液 0.1 ml をとり、上記方法により行った。

実施例16：ウエスタンブロッティング

HeLa細胞をSDS溶液（3% SDS、0.125 M Tris (pH6.8)、20 mM ジチオスレイトール、20% グリセロール）により100℃で10分間抽出し、SDS-PAGE し、ポリビニリデンジフルオライド微孔性メンブレン（Millipore, Bedford, MA）に移した。そのメンブレンをハイブリドーマ培養液と37℃で30分間反応させた後、洗浄し、さらに西洋ワサビパーオキシダーゼを結合した抗マウスIgG溶液と37℃で30分間反応させた後、再び洗浄した。シグナルは、市販のエンハンスト・ケミルミネッセンス・テクニック（enhanced chemiluminescence technique (Amersham Bioscience)）システムにより検出し、ウエスタンブロット解析をした。

実施例17：抗Mina 53モノクローナル抗体の精製

プリスタン（2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン）を2週間程度前にあらかじめ腹腔に注射したマウス（balb/c）に、上記ハイブリドーマを腹腔に注射した（ 2×10^6 /頭）。10～20日後、18ゲージ注射針を用いて腹水を回収した。腹水は、硫酸分画し、抗体活性を示す画分を、10 mM Tris (pH8.0) により透析した。あらかじめ10 mM Tris (pH8.0) に平衡化したDE-52（ワットマン社）に上記画分を添加し、0-0.2 M の塩化ナトリウムの濃度勾配をもつ10 mM Tris (pH8.0) により溶出し、溶出画分中の抗Mina 53抗体活性を測定した。高い抗Mina 53抗体活性を持つ画分を集めて精製し、精製抗Mina 53モノクローナル抗体を得た。

実施例18：抗ヒトMina 53抗Mina 53モノクローナル抗体を用いた組織診断

抗ヒトMina 53マウス抗Mina 53モノクローナル抗体を用いて、大腸がんを次のようにして染色した。その結果、非がん部組織に比べて、大腸がん部分が強く染色された。

（抗ヒトMina 53マウス抗Mina 53モノクローナル抗体による組織染色法）

まず、ホルマリン固定し、パラフィン包埋したブロックを約3 μ m 厚さにスライスし、スライドグラス上にマウントした。このスライドグラス上の切片をキシレンに浸けて37℃で15分間放置した。15分後、新しいキシレンに変えた。このキシレン処理を全部で3回行って脱パラフィン処理を行った。このように脱パラフィン処理を行った切片を、99%エタノールに浸け、10分後に新しい99%エタノール

に変えた。このエタノール処理を全部で3回行った後、さらに95%、90%、70%と段階的に含水率の高いエタノールに各5分間ずつ浸けた。更に、水に5分間浸けて水洗した。水洗した切片を、10mMクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で121℃で20分間オートクレーブ処理し、抗原性を回復させた。その後、室温に戻してから水洗し、PBS溶液に浸漬した。

次に、0.05%ツイーン20を含むPBS溶液で1回洗った後、試料を3% H₂O₂のPBS溶液を用いて室温で30分間処理することにより、内在性のパーオキシダーゼ活性を失活させた。

得られた試料を0.05%ツイーン20を含むPBS溶液により2回洗浄し、1%スキムミルクと5%ウサギ血清を含むPBS溶液を用いて室温で30分間処理することにより、抗体の非特異的結合を防ぐブロッキング操作を行った。

抗体を1%スキムミルクを含むPBS溶液により希釈し最終濃度を3.5 µg/mlにし、上記のようにブロッキング操作をして得られたスライドガラス上の試料の上に添加し、4℃で一夜反応させた。翌日、試料を0.05%ツイーン20を含むPBS溶液によって3回洗浄し、ビオチン化した抗マウスIgGウサギ抗体と室温で30分間反応させた。

反応後、得られた試料を0.05%ツイーン20を含むPBS溶液により3回洗浄後、西洋ワサビパーオキシダーゼを結合させたストレプトアビジンと反応させた。得られた試料を0.05%ツイーン20を含むPBS溶液により3回洗浄後、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) 基質溶液を加え室温放置し、パーオキシダーゼ活性を持つ部分を茶色に発色させた。その後、4分間水洗することにより、パーオキシダーゼ反応を止めた。次いで、ヘマトキシリンで染色した後、スライドガラスを脱水し包埋した。

実施例19：抗ヒトMina53モノクローナル抗体を用いた溶液中のMina53タンパク質の定量

上記で得られた抗Mina53モノクローナル抗体を2つ組み合わせることによりMina53タンパク質をサンドウィッチして定量をすることができた。

(マイクロタイタープレートによるMina53の定量)

抗Mina53モノクローナル抗体を、西洋ワサビパーオキシド結合キット (Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas, USA) を用いてキットの指示に従って標識して、西洋ワサビパーオキシドを結合した抗Mina53モノクローナル抗体を調製した。

更に、0.1 M クエン酸塩 / 0.2 M Na₂HPO₄ 溶液に 0.4 mg/ml の濃度で o-PDA を溶解し、-80℃で保存し、使用直前に1000分の1容量の5%過酸化水素水を加えて、o-フェニレンジアミン溶液を調製した。

他方、もう1つの抗体 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 10 mM Tris (pH 6.8) 溶液に溶解し、この溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに 50 μl ずつ加え、37°Cで2時間あるいは4°Cで一昼夜インキュベーションした。続いて、抗体溶液を捨てた後、1%スキムミルクを含むPBS溶液を 200 μl 加え、37°Cで2時間あるいは4°Cで一昼夜インキュベーションした。この後、1ウェルあたり試料 50 μl を加え、37°Cで2時間あるいは4°Cで一昼夜インキュベーションした。この際、必要に応じて、試料はウシ胎児血清を用いて希釈した。次に、PBSを用いて3回洗浄した後、希釈した西洋ワサビパーオキシドを結合した上記抗体溶液を1ウェルあたり 50 μl 加え、37°Cで2時間あるいは4°Cで一昼夜インキュベーションした。更に、PBSを用いて3回洗浄した後、*o*-フェニレンジアミン溶液を1ウェル当たり 50 μl 加え、37°Cで10–15分間インキュベートして、その発色を定量した。

実施例20：

(ウェスタンブロッティング)

ウェスタンブロッティング分析のために、ヒト大腸がん細胞株HT-29、SW-620ならびにWiDrをそれぞれ10%FCS含有ダルベッコ改変イーグル培地で培養し、ヒト前骨髄細胞白血球細胞株HL60を10%FCS添加RPMI 1640培地で培養した。

このように培養した細胞を、トリプシンおよびEDTAを含むリン酸緩衝液(PBS)で処理して集め、PBSで洗浄した。次いで、細胞を、3%SDS、50 mM ジチオスレイトールおよび20%グリセロールを含む0.125 M トリスHClバッファ (pH 6.8) 溶液に懸濁し、10分間煮沸して4~20%勾配SDSポリアクリルアミドゲルを用いて分離した。タンパク質をポリビニリデンジフルオリドマイクロポアメンブレンに移し、1%スキムミルクを含むPBS溶液で処理し非特異的結合部位をブロックした。マウス抗Mina53モノクローナル抗体およびHRP共役ヤギ抗マウスIgG抗体で処理した後、エンハンスト・ケミルミネッセンス(ECL) ウェスタンブロッティング試薬システムを用いてシグナルを検出した。ローディングコントロールとして、メンブレンを剥離バッファで処理した後、抗 β アクチンモノクローナル抗体によって再プローブした。

図6Aはウェスタンブロッティング分析結果を示している。ウェスタンブロッティング分析は、TPAの非存在下で培養したHL60細胞(レーン1)、TPAの存在下で培養したHL60細胞(レーン2)および大腸がん細胞株WiDr(レーン3)、HT-90(レーン4)ならびにSW-620(レーン5)からそれぞれ調製した細胞溶菌液を電気泳動後、抗Mina53モノクローナル抗体を用いて行った(上側パネル)。

(間接免疫蛍光染色)

間接免疫蛍光染色するために、上記HT-29、SW-620ならびにWiDr細胞を、6ウェルプレートガラスカバースリップ上で生育させ、メタノール中において -20°C で10分間固定した。1%スキムミルクを含むPBS溶液でブロッキングした後、マウス抗Mina53モノクローナル抗体および抗ヌクレオリン (nucleolin) ラビットポリクローナル抗体を添加して、 37°C で120分間インキュベーションした。0.1%スキムミルクを含むPBS溶液で3回洗浄した後、アレクサ (Alexa) 488共役抗マウスIgG抗体およびCy3共役抗ラビットIgG抗体を添加し、 37°C で120分間インキュベーションし、0.1%スキムミルクのPBS溶液で3回洗浄した。最後に、細胞をイムノン (Immunon) 内に包埋して蛍光顕微鏡で観察した。

図6Bは、細胞内におけるタンパク質Mina53の局在を示している。図6において、大腸がん細胞株SW-620内におけるタンパク質Mina53の局在を、抗Mina53モノクローナル抗体で間接免疫染色することによって目視観察した結果を示した (a)。また、抗ヌクレオリンラビットポリクローナル抗体で染色した結果を目視観察した結果を示した (b)。更に、両者を重ねた画像を示した (c)。

実施例21:

24名の原発性大腸腫瘍患者から採取した標本をホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した試料を使用した (Fujitani N, et al.: Glycoconjugate J 2000, 17:331-338)。これらの標本には、23例の大腸腺がんが含まれていて、そのいくつかの例は高度に浸潤していて、またいくつかの例はリンパ管浸潤を示していた。また1例は腺腫であった。組織切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン (HE) 染色に基づいた組織病理学的勾配システムに従って、高分化、中分化および低分化とに分類した。組織の特徴の概要を表1に示す。

実施例22:大腸がん細胞の免疫染色

脱パラフィン化した10%ホルマリン固定・パラフィン包埋大腸がん組織を、ストレプトアビジン-ビオチン・コンプレックス・イムノパーオキシダーゼ法によって免疫染色した (Fujitani, N., et al.: J Histochem Cytochem 2000, 48:1649-1656)。

抗原を回復させるために、切片をマウントしたスライドを、10mMクエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 中で20分間オートクレーブした。3%過酸化水素を含むPBS溶液、次いで1%スキムミルクと5%ラビット血清を含むPBS溶液で前処理した後、最終濃度 $3.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ の抗Mina53抗体を含む1%スキムミルク溶液または抗Ki-67抗体を、湿ったチェンバー中において 4°C で一昼夜反応させ

た。0.05%ツイーンのPBS溶液で3回洗浄した後、切片を、ビオチン化ラビット抗マウスIgG抗体、続いてHRP-ストレプトアビジン・コンジュゲートとインキュベーションした。次いで、3,3'-ジアミノベンジジンと過酸化水素を用いて、Mina53については4分間、Ki-67については2分間発色させた後、水で洗浄して反応を停止させた。ヘマトキシリンで対比染色した後、スライドを脱水し、カバーガラスをかけた後、顕微鏡で観察した。

(免疫組織化学的染色の評価)

下表1に示す染色強度については、各切片を目視観察することによって0から3までの点数で記録した。点数は、最高の染色強度を有する切片を3点とし、最低の染色強度を有する切片を1点とし、染色しなかった切片を0点とした。染色された細胞の割合を推定するために、画像をデジタルカメラで撮影し、表示視界内の陽性細胞の数を数えて、染色細胞の割合(%)で表した。また、下表1における染色インデックスは、染色強度に染色細胞の平均割合%を乗じた値として計算した。

実施例23：リコンビナントヒトタンパク質Mina53の定量

大腸菌で作製したリコンビナントヒトタンパク質Mina53を0.1-1000 ng/mlの濃度になるようにウシ胎児血清を用いて調整し、ELISA法により定量した。その結果、1-1,000 ng/mlのリコンビナントヒトタンパク質Mina53を定量することができた(図10)。

実施例24：

実施例23に示した方法により正常人からの血液中のMina53の量を定量したところ、0-5 ng/mlのMina53を検出した。また、乳がんの患者の血液中に正常値よりも高いレベルである64 ng/mlのMina53を検出した(図11)。

上記実施例から、このELISA法は血中のMina53を定量することができることがわかる。

実施例25：食道がん細胞の染色

上記実施例で得た抗Mina53モノクローナル抗体を用いて食道がん細胞を染色し、現在ヒト食道がん細胞の染色に使用されている抗Ki-67モノクローナル抗体による食道がん細胞の染色による染色具合と比較した。

38人の食道がん患者からの食道がん組織を、抗Mina53モノクローナル抗体あるいは抗Ki-67モノクローナル抗体により染色し、それぞれの試料における抗Mina53モノクローナル抗体あるいは抗Ki-67モノクローナル抗体の染色インデックスを求めた。本実施例において、染色インデックスは、抗Mina53モノクローナル抗体の染色インデックスを横軸に、抗Ki-67モノクローナル抗体

の染色インデックスを縦軸にとり、それぞれの食道がん組織の価をプロットした。なお、染色インデックスは、染色強度 x 染色されている細胞の割合により求めた。その結果は図13に示す。

また、食道がんのがん悪性度と、Mina 53あるいはKi-67の染色インデックスとの関係を調べ、その結果を図12に示す。図12 (A) にはMina 53の染色インデックスと食道がんのがん悪性度との関係を、また図12 (B) にはKi-67の染色インデックスと食道がんのがん悪性度との関係を示している。なお、図12 (A) は、Mina 53の染色インデックスが0~1.8と、1.9~4との2つのグループに分け、カプラン-マイヤー (Kaplan-Meier) 法により解析した結果を、また、図12 (B) は、Ki-67の染色インデックスが0~0.6と、0.7~4.0との2つのグループに分け、カプラン-マイヤー (Kaplan-Meier) 法により解析した結果を示している。

結果

上記実施例では、c-My c活性を条件付に活性化するために、エストロゲン誘発性My cシステムを使用した (Eilers, M., et al.: (1989) Nature 340, 66-68)。キメラタンパク質c-My c ERは、ヒトc-My cと、ヒトエストロゲンレセプターのエストロゲン結合ドメインとから構成されている。c-My c ERは、エストロゲンの不存在下で細胞骨格成分に結合している。エストロゲンもしくはその誘導体4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) がキメラタンパク質に結合したとき、細胞骨格から遊離してc-My cとして機能する。ヒト膠芽腫細胞株T98Gを異所性c-My c活性を導入する親細胞として使用した。c-My c ERタンパク質 (T98Gmycer-2) を発現するT98G細胞株を確立した。

指数関数的に増殖する状態にある細胞を、OHTの存在下もしくは不存在下で20時間培養し、全RNAを単離し、上記に記載したcDNAマイクロアレイ分析に付した。すでに報告されているMy c標的遺伝子、つまり、ODCと、ヌクレオリン (nucleolin) の特定のシグナルは、c-My c ERの活性に伴って、それぞれ2.6倍と1.6倍増加した。これらの結果は、My c標的遺伝子がこれらの実験システムにより検出され得ることを示している。

上記実施例において、c-My cの機能を調べるために、c-My c ER活性化によって刺激され発現上昇した遺伝子のうちでヒト発現配列タグ (EST) 配列について調べた。その結果、ESTクローンW27666に対するシグナルがc-My c活性によって1.9倍程刺激され発現上昇することが分かった。

この上昇率は、c-My c 標的遺伝子であるODCとヌクレオリンについてここで測定した値と類似していた。

W27666の5'-上流部をコードするcDNA分子を、ヒト赤血球腫瘍白血病細胞 (Human Erythroid Leukemia: HEL) ライブラリーから5'-RACEプロトコルを用いて単離した。また、5'-末端の配列が異なる2種のcDNAを単離した。5'-RACE実験からのヌクレオチド配列とESTクローンW27666のそれに一致するヌクレオチド配列を有するESTとを用いて、mRNA分子の全配列を予測した。予測分子の5'-末端の配列と3'-末端の配列とに一致するプライマーを使用して、2.3 kb長cDNAをRT-PCRプロトコルによって増幅した。増幅したcDNAはベクターにクローン化してその配列を決定した。得られたcDNAの大部分は、52800.28 Daの予測分子量を有する465個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている (配列表の配列番号1)。

また、このタンパク質の細胞内での局在を、特異的な抗体で間接免疫蛍光染色することによって可視化したところ、このタンパク質は核中に局在していることが判明した。更に、大きな固まり状の染色が核中に検出された。抗ヌクレオリン抗体による二重染色では、これらの点が核小体と一致していることが示された。GFP融合mina53タンパク質を細胞に発現したときにも、この融合タンパク質が核ならびに核小体に蓄積されることが観察された。これらの結果は、Mina53が核質ならびに核小体に局在している核タンパク質であることを示している。

464個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするcDNA (52672.15 Daの予測分子量を有する) もクローン化した。このタンパク質には主タンパク質の297Qが欠失している。また101 bpがmina53 cDNAの中央部に挿入されたcDNAも検出された。挿入配列中に停止コドンがあり、このcDNAはMina53タンパク質の1-262個のアミノ酸と、18個の新規なアミノ酸とをコードしている。このmRNAの量は少ないけれども、このmRNA分子は、ヒト赤白血病細胞株 (HEL)、卵巣ムチン様嚢胞腺がん細胞株 (MCAS)、ならびに結腸腺がん細胞株 (WiDr) から作成したcDNAライブラリ中に検出された。

Mina53がヒト、ラット、マウスに保存されていることについて調べた結果、mina53のオルソログ遺伝子であると思われるマウスcDNAがBlastサーチ (GenBankAcc: NM_025910) によって見出された。この配列を基にしてRT-PCRプロトコルによってマウスmina53 cDNAを単離した。この配列は (GenBankAcc: NM_025910) のものとは塩基配列が異なっており、アミノ酸配列も2つ異なっていた (配列表の配列番号2)。また、300 bp長を有し、マウスとヒトのmin

mina 53 の 3'-非翻訳領域に相同するラット EST (GenBankAcc: H32933) も見出された。ラット mina 53 mRNA を増幅すると、予測されたプライマーを使用した RT-PCR プロトコルによってラット mina 53 cDNA を単離した (配列表の配列番号 3)。ラットならびにマウス mina 53 のオープンリーディングフレーム (ORF) は 465 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。ラットならびにマウス mina 53 タンパク質のアミノ酸配列は 86% が互いに一致していて、ヒトならびにマウス Mina 53 タンパク質のそれは 72% が一致していて、ヒトとラット Mina 53 のそれとは 75% 一致していた。このことは、mina 53 が哺乳動物に保存されていることを示している。メチオニン開始コドンの 3 bp 上流のヌクレオチドは、3 種全ての mina 53 中において "A" であり、コザック・コンセンサス配列に一致している。ラット mina 53 遺伝子やマウス mina 53 遺伝子も、ヒト mina 53 遺伝子と同様に細胞増殖のメカニズム解明に役立ち、がん細胞の診断法などの研究にも有用である。

上記実施例において、mina 53 mRNA の発現についてノーザンブロット分析によって調べた mina 53 mRNA の発現状況を図 2 に示す。

図 2 A は、mina 53 mRNA の発現レベルが T98G 細胞中の c-myc 発現レベルと関連していることを示している。血清飢餓状態の T98G 細胞を最終濃度が 10% になるように血清を添加して刺激した。RNA を所定の時間に単離し、同量の RNA をノーザンブロット法によって分析して mina 53 と c-myc mRNA とを検出した (図 2 A の左側の泳動図)。電気泳動した 28S と 18S リボソーム RNA を電気泳動した図は、加えた RNA がほぼ同じ量であることを示している。検出された mRNA を定量しプロットした (図 2 A の右側のグラフ)。これらの結果は、mina 53 mRNA の発現が 5 倍増加したことを示している。この増加は血清添加後 6 時間して検出できるようになり、12 時間後に最大になった。c-myc mRNA 発現量は、血清添加後 3 時間して検出できるようになり、12 時間して最大となった。これらの結果は、c-myc mRNA の発現上昇に引き続き、mina 53 mRNA の発現上昇が起こることを示唆している。

図 2 B は、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL60 において、mina 53 mRNA の発現レベルの低下と c-myc mRNA の消滅とが平行的な関係があることを示している。HL60 細胞を TPA で分化すると、c-myc の発現レベルが減少する。この実験系を使用して、Myc 標的遺伝子が、血球細胞分化を伴う Myc の発現低下によって影響されるかどうかを調べた。この実験では、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL60 を TPA 10nM に接触させて所定の時点で RNA を単離し、同量の RNA をノーザンブロット分析に

よって分析して、*mina 53*と、*c-myc*と、*CD18*mRNAとを検出した(図2Bの左側の泳動図)。更に、それぞれのmRNAを定量してプロットした(図2Bの右側のグラフ)。

その結果、HL60細胞をTPA 10 nM で培養後9時間して、分化マーカー*CD18*の発現が増加し始めて、誘発発現量が24時間目に3倍になったことが観察され、この系中で分化が確認された。TPA添加3時間後、*c-myc*mRNAレベルが低下し始めて、7時間後に5分の1になった。*c-myc*mRNAの低下に引き続いて、*mina 53*mRNAの低下が連続して起こり、*mina 53*mRNAレベルが12時間後に5分の1になった。これらの実験から、*mina 53*の発現パターンが*c-myc*の発現と因果関係があることが示された。

次に、*c-Myc*活性化の*mina 53*に対する効果を調べた。図2Cは、*c-Myc*ERタンパク質を発現するT98G細胞(T98Gmycer-2細胞)における*mina 53*mRNAの誘発状態を示している。ここでは、T98Gmycer-2細胞と親T98G細胞とを0.25%血清添加培地で40分間40時間培養した後、OHT 200 nM で処理し、RNAを所定の時間に単離した。図中、符号+は、OHT添加20分前にシクロヘキシミド(CHX) 20 µg/ml を添加したことを示している。同量のRNAをノーザンブロット法による分析によって*mina 53*mRNAが検出された(図2Cの左側の泳動図)。検出されたmRNAを定量しプロットした(図2Cの右側のグラフ)。

図2Cに示すように、OHTで処理したT98Gmycer-2細胞中では、*mina 53*mRNAのレベルは9時間一定して上昇し、誘発発現量がほとんど3倍ほど増加した。これに対して、T98G親細胞をOHTで処理しても*mina 53*mRNAレベルの刺激は上昇しなかった。OHTによるT98Gmycer-2細胞中での*mina 53*mRNAの誘発発現誘導はタンパク質合成インヒビターであるシクロヘキシミドの存在下でも維持された。一方、シクロヘキシミドで処理しても、T98G親細胞に対しては*mina 53*mRNAレベルに対する効果はほとんど無かった。これらの結果は、*mina 53*遺伝子が*Myc*の直接の標的であることを示している。

*Myc*の活性化による*Mina 53*タンパク質の発現誘導を図3を参照して説明する。図3は、特異的な抗体を使用した*Mina 53*タンパク質のウェスタンブロッティング分析を示す図である。まず、図3Aを参照して、*Myc*の活性化による*Mina 53*タンパク質の発現上昇を説明する。T98GおよびT98Gmycer-2細胞をOHT 200 nM の存在下もしくは不存在下で20時間培養した。ヒト*Mina 53*タンパク質に対する特定の特異的な抗体を使用したウェスタンブロッティングにより*Mina 53*タンパク質を分析した(左側パネル)。HL60細胞を、TPA 10 nM の存在下もしくは不存在下で20時

間培養して、ヒトMina53タンパク質に対する特異的な抗体と、抗c-My c抗体に対する特異的な抗体とを使用したウェスタンブロッティングにより、TPA 10 nM の存在下もしくは不存在下で20時間培養した(右側パネル)。タンパク質の染色に対するプロファイルも示した(下側パネル)。

かかる特定の特異的な抗体を使用したウェスタンブロッティングによって、アミノ酸配列から予測されたのと同じ移動度を有するバンドをT98G細胞とHL60細胞とにおいて検出した(図3A)。Mina53のバンド強度は、c-My c ERがT98Gmycer-2細胞中でOHTによって活性化されたときに増加した。HL60細胞をTPA 10 nM の存在下で20時間培養した後、c-My cとMina53タンパク質との発現は減少した。

図3Bに示すように、ヒトc-My cと、その活性化ドメイン(TAD)の大部分を欠失している変異c-My cをコードする発現ベクターと、空のベクターとをラット3Y1繊維芽細胞中に導入して安定して発現する細胞株を確立した。3Y1MycAと3Y1MycBとは野生型ヒトc-My cを保持発現していて、3Y1Myc(dTAD)Aと3Y1Myc(dTAD)BとはTAD欠失c-My cを保持発現していて、3Y1ベクターは空のベクターを保持している。抗Mina53抗体(上側パネル)と抗c-My c抗体(中間パネル)とを使用してウェスタンブロッティングによってタンパク質を分析した。通常の染色法によるタンパク質のプロファイルも示した(下側パネル)。

My cによるMina53の発現制御は、ラット繊維芽細胞株3Y1中で確認された(図3B)。ヒトc-My cを3Y1細胞に安定して導入したとき、Mina53の発現は、c-My c発現を用量依存的に増加した(3Y1、3Y1ベクター、3Y1MycAおよび3Y1MycBに対するレーンを比較)。また、転写活性化ドメイン(TAD)が欠失しているc-My c突然変異体を3Y1細胞に導入したMy c突然変異体においては、野生型c-My cの発現に匹敵するレベルでMina53を発現したときには(3Y1MycAと3Y1Myc(dTAD)Aとを比較)、Mina53の発現は増加しなかった。My c突然変異体が野生型c-My cの発現よりも遥かに高いレベルで発現しても(3Y1ベクター、3Y1MycBおよび3Y1Myc(dTAD)Bのレーンを比較)、Mina53の発現は増加しなかった。これらの結果から、c-My cがmina53の発現をc-My cの転写活性化ドメイン(TAD)を使って活性化していることを示している。

図1Aは、ヒトmina53遺伝子の構造の概略を示している。図中、ボックスはエクソンを示し、閉鎖部はオープンリーディングフレーム(ORF)を示し、開放部は5'未翻訳領域と3'未翻訳領域を示す。ヒトmina53遺伝子は12個のエクソンから構成されていて、2個の転写開始部位としてエクソン1aと1bが存在する。転写方向は左側から右側であり、転写はエクソン1aまたはエクソン1bから

開始する。エクソン1 bは、エクソン1 aの0. 25 kb下流に存在する。翻訳開始部位はエクソン2に存在する。停止コドン (TAG) はエクソン10に存在する。464個のアミノ酸 (297Qを欠失している) をコードするcDNAはエクソン7の最初の3 bpが欠失している。エクソン5とエクソン6との間に存在するエクソン5' は、主cDNAの中央部に挿入された101 bpの配列をコードしている。

mina53 cDNA配列を含むヒトゲノミックDNA配列はHTGS (GenBankAcc: AC026100, AC073245, AC024892) 中に見出すことができる。イントロン2 (エクソン2とエクソン3との間) の長さはGenBankのデータと異なっていたので、エクソン2とエクソン3中の配列に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRで増幅し、その長さを5. 2 kbであることを決定した。UCSGenomeBrowser のマッピングデータは、mina53遺伝子が第3番染色体 (3q12. 1) にマップされていることを示している。

図1 Bは、エクソン1 bが2個のE-ボックス (CACGTGエレメント) を有していることを示している。これら2個のE-ボックスの1番目と2番目とをそれぞれE-ボックス1とE-ボックス2と命名した。

mina53遺伝子のプロモータ活性を調べるために、エクソン1 aから上流の領域と、エクソン1 aと、エクソン1 bと、イントロン1の1部とを含むヒトmina53ゲノミックDNAフラグメントをファイアフライ・ルシフェラーゼ (firefly luciferase) cDNAに結合して、レポータープラスミド、pMina(W)luci を構築した (図1 B)。図中、pMina(dE)luci は2つのE-ボックスを持つ部分を欠損させたレポータープラスミドを、pMina(mE1/2)luci は2個のE-ボックスに変異を導入したレポータープラスミドを、pMina(mE1)luci はE-ボックス1に変異を導入したレポータープラスミドを、pMina(mE2)luci はE-ボックス2に変異を導入したレポータープラスミドを示している。

図1 Cは、T98G細胞中でのトランジェント発現アッセイによって、DNAフラグメントがプロモータ活性を有していることを示している。

c-My cERをOHTによって活性化すると、ルシフェラーゼ活性は3倍まで増加した。この刺激は、mina53 mRNAに対して観察されたものに匹敵している (図2 C)。

pMina(W)luci から2個のE-ボックスを除去したとき、ルシフェラーゼ活性は、c-My cERキメラタンパク質 (図2 C、pMina(W)luci のデータ) を活性化しても増加しなかった。その2個のE-ボックスをCACGTGからCACCTGに変異した pMina(mE1/2)luci からの発現はc-My cの

活性化によっても増加しなかった。これらの結果は、pMina (W) luci の発現が CACGTG エLEMENT によって刺激 E-ボックスを介して活性化されることを示している。

どちらの E-ボックス CACGTG ELEMENT が機能的であるかを決定するために、それぞれの E-ボックスの配列を CACGTG から CACCTG に変異した異なる CACGTG ELEMENT を有するレポータープラスミド pMina (mE1) luci と pMina (mE2) luci とをそれぞれ構築した (図 1 B)。図 1 C に示すように、E-ボックス 1 の変異による効果はほとんど無かった。他方、E-ボックス 2 を変異した場合、c-My c による刺激は著しく低下した。これらの結果は、c-My c が E-ボックス 2 を介して機能していることを示している。

HL 6 0 細胞が増殖応答している間 c-My c タンパク質がインビボ (in vivo) で内因性 mina 5 3 遺伝子に結合することを調べるために、文献記載の方法によってクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行なった (Boyd, K.E., et al.: (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2529-2537; Boyd, K. E., et al.: (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13887-13892)。抗 c-My c 抗体で免疫沈降後、各サンプル中の内因性 mina 5 3 遺伝子フラグメントを PCR でモニターし、mina 5 3 遺伝子中のエクソン 1 b とイントロン 1 の部分を特異的に増幅した。

図 4 に示すように、2 個の異なる抗 c-My c 抗体は、増殖期の HL 6 0 細胞から mina 5 3 遺伝子を免疫沈降したが、TPA と共に培養すると、HL 6 0 からは mina 5 3 遺伝子断片が免疫沈降されなかった。また、mina 5 3 ゲノミック DNA フラグメントを精製し検出した場合、非特異的抗体が mina 5 3 DNA フラグメントを免疫沈降しなかったため、mina 5 3 遺伝子に結合する c-My c に依存していることが確認された。更に、染色体 2 2 中の検出可能な遺伝子がいずれもない染色体領域に位置している E-ボックス近傍のゲノムフラグメントは、c-My c に対する抗体によって免疫沈降しなかったため、mina 5 3 遺伝子で検出された結合は特異的であることが確認できた。これらの結果は、増殖期の HL 6 0 細胞中において、c-My c が mina 5 3 遺伝子に特異的に結合していることを示している。

以下、Mina 5 3 が HeLa 細胞の増殖と、c-My c を著しく発現する 3 Y 1 細胞との増殖に関与していることを図 5 を参照して説明する。

mina 5 3 の生物学的機能を調べるために、上述したように、siRNA 二本鎖を使用して Mina 5 3 タンパク質の発現を特異的に阻害し、siRNA を導入して 40 時間後 Mina 5 3 タンパク質をモニターした。

図5Aで示すように、Mina53タンパク質の発現は、ヒト細胞株であるHeLa細胞中においてヒトmina53に特異的なsiRNA二本鎖によって特異的に減少した。これに対して、非特異的なsiRNA、つまり、mina53とは逆方向の配列を有する二本鎖（コントロール）と、ラットmina53に特異的な二本鎖によつては、Mina53タンパク質の発現は減少しなかった。つまり、Mina53タンパク質の発現は、c-Mycを著しく発現するラット3Y1細胞（3Y1MycB）においてはラットmina53に特異的なsiRNA二本鎖によって特異的に減少するのに対して、コントロールとしてのsiRNAとヒトmina53に特異的な二本鎖によつては減少しなかった。

図5Bに示すように、Mina53の発現が減少したときには、細胞増殖は非常に抑制される。つまり、HeLa細胞と3Y1MycB細胞の増殖はヒトならびにラットMina53それぞれに特異的なsiRNA二本鎖の導入によってほとんど完全に停止する。

また、この発明に係る抗Mina53モノクローナル抗体は、タンパク質Mina53の発現をウェスタンブロッティング分析で調べたところ、白血病細胞株HL60を用いたウェスタンブロッティング分析によつて、分子質量53kDaの単一バンドを認識することができることを示した（図6A、レーン1）。また、上記抗Mina53モノクローナル抗体を用いた免疫ブロッティング分析によつて、TPAで細胞を処理しても、53kDaのバンドのシグナルが減少した（図6A、レーン2）。これに対して、TPA処理によつては β -アクチンの発現は実質的には減少されないという特異性が確認された（図6A、レーン1、2）。

他方、HeLa細胞中に発現させたグリーン蛍光タンパク質（GFP）に細胞融合させたタンパク質を用いた別の実験においては、この抗Mina53モノクローナル抗体が、内在性タンパク質Mina53に加えて、HeLa細胞中に発現させたグリーン蛍光タンパク質（GFP）に細胞融合させたタンパク質Mina53についても単一バンドを発生した。

更に、この発明に係る抗Mina53モノクローナル抗体を用いた免疫ブロッティング分析によつて、3種類の増殖期の大腸がん細胞株HT-29、WiDrおよびSW-620を用いて、大腸がん細胞株におけるヒトタンパク質Mina53の発現を調べた結果、抗Mina53モノクローナル抗体は、3種類すべての細胞株において53kDaの単一バンドを認識した（図6A、レーン3-5）。このことは、これらの細胞株がタンパク質Mina53を発現し、抗Mina53モノクローナル抗体が、他のタンパク質と交差反応せずに大腸がん細胞中のタンパク質Mina53を特異的に認識していることを示している。

一方、これらの細胞株におけるタンパク質Mina53の発現レベルは、TPAによつて実験的に減少

させたHL 6 0細胞中のタンパク質Mina 5 3の発現レベルよりもより一層高かった(図6 A、レーン2 - 5)。他方、上記3種類の大腸がん細胞株におけるアクチンレベルは、TPA処理したHL 6 0細胞のアクチンレベルよりも高くはなかった。これらの結果は、上記3種類の大腸がん細胞株が最終的に分化したHL 6 0細胞よりも比較的高いレベルのタンパク質Mina 5 3を含んでいることを示唆している。

その上、抗Mina 5 3モノクローナル抗体と抗ヌクレオリンラビット抗体とを用いた二重細胞免疫蛍光染色法によって、大腸がん細胞内におけるタンパク質Mina 5 3の局在状態を調べたところ、抗Mina 5 3モノクローナル抗体は、細胞SW-6 2 0内の核を特異的に染色するとともに、その核質内の核小体に、ヌクレオリンに対するシグナルと重複する強力な点状の染色を示した。その他の2種類の細胞株も同一の免疫蛍光染色パターンを示した。これらの結果から、タンパク質Mina 5 3は、本発明者らがHeLa細胞についてすでに示したように(Tsuneoka, M., et al., ibid)、核小体に凝縮した状態で核内に局在していることを示している。

(大腸がん組織内におけるタンパク質Mina 5 3の発現)

この発明の抗Mina 5 3モノクローナル抗体を使用して、大腸がん組織内のタンパク質Mina 5 3を検出するとともに、HE染色法を使ってがん領域を識別した。図7 Aに示す切片には中程度に分化した大腸がん細胞が含まれていた。図7 Bに示すように、がん領域内のタンパク質Mina 5 3は顕著に染色されているのに対し、腫瘍周辺の非腫瘍上皮細胞はほとんど染色されていなかった。染色は、主に核内に見出され(図7 EおよびF)、さらに大腸がん細胞株において得られた結果(図7 B)と同様のパターンを示す点状の染色(おそらく核小体)が見出された。該抗体を使用せずに切片を培養したとき(図7 D)または過剰量の組換えタンパク質Mina 5 3の存在下で培養したときには、この核内の染色は認められなかった。がん組織の切片のいくつかでは、がん細胞が主ながん領域から離れて局在する上皮細胞の直下のリンパ管内に見出された。この発明に係る抗Mina 5 3モノクローナル抗体は、これらのがん細胞を顕著に染色したのに対して、その周囲の非がん細胞をわずかに染色しただけであった(図8 A)。また、大腸の深層にあるリンパ腺中に侵入した細胞も、タンパク質Mina 5 3に対して強い免疫反応を示していたのに対して、その周囲の非腫瘍性細胞は染色されていなかった(図8 B)。更に、抗Mina 5 3モノクローナル抗体は、深部に侵入した腫瘍を染色するとともに(図8 C)、繊維間質内のほとんど分化していない腫瘍細胞を識別しているのに対して(図8 C)、これら腫瘍細胞周囲の非腫瘍細胞を染色しなかった。これらの結果は、浸潤したりまたは転移した腫瘍中にもタンパク質Mina 5 3が高発現されていることを示している。

(大腸がんの組織病理学的等級におけるタンパク質Mina53の発現)

大腸腺がん患者と、腺腫患者からの標品中にタンパク質Mina53を免疫組織化学的染色法によって検出した。その概要は表1に示している。表1に示すように、タンパク質Mina53は、大腸がんのすべての組織病理学的等級において発現しており、つまり、十分に分化した腫瘍(図9A)、中程度に分化した腫瘍(図7B)およびあまり分化していない腫瘍(図2F)のいずれにおいても顕著に染色されていた。また、それらの平均染色インデックスはそれぞれ2.28、1.78および1.85であった(表1)。これらの結果は、十分に分化した腫瘍は中程度に分化した腫瘍やあまり分化していない腫瘍に比べてより高い染色強度を示す傾向がわずかにあるけれども、腫瘍の病理学的等級と染色強度との間には因果関係がないことを示唆している。更に、タンパク質Mina53は腺腫において高発現されることから(図9C)、タンパク質Mina53の発現上昇は、大腸がん発生の一般的かつ比較的初期の事象であることを示唆している。その上、染色はすべての場合において核に限られている(図7Eおよび図7F)。

要約すると、この発明に係る抗Mina53モノクローナル抗体を使用して大腸がん細胞株と大腸がん組織中におけるタンパク質Mina53の発現を調べたところ、調べた3種類の大腸がん細胞株でMina53の顕著な発現が認められ、また、調べたほとんどすべての大腸がん組織においてMina53の発現上昇が認められた。また、タンパク質Mina53は、いずれの組織病理学的等級の大腸がん、つまり、十分に分化した等級、中程度に分化した等級ならびにあまり分化していない等級の腫瘍において発現したのに対して、ほとんどの非がん細胞においてはMina53に対する染色はほとんどもしくは全く認められなかった。更に、がん細胞におけるMina53発現の上昇は、がん細胞の場所に無関係に観察された。換言すれば、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、リンパ管侵入ならびに隔離腫瘍細胞において、タンパク質Mina53に対して著しい染色が観察された。

表1：

患者 no.	組織 学的 等級	染色がん細胞の 割合 (%)		染色強度		染色インデックス	
		Mina53	Ki-67	Mina5	Ki67	Mina53	Ki-67
				3			
1	低	84.5	46.2	1	1	0.85	0.46
2	低	86.3	63.2	3	3	2.91	2.44

3	低	79.6	88.9	2	3	1.59	2.67
	*)	100.0	96.3	2	2	2.00	1.93
	**)	0	31.9	0	2	0.00	0.64
4	低	94.2	52.4	2	3	1.89	1.57
5	低	100.0	100	2	3	2.00	3.00
6	中	94.3	81.6	2	2	1.89	1.63
7	中	100.0	76.2	3	3	3.00	2.29
8	中	97.5	87.4	2	3	1.95	2.62
9	中	100.0	83.6	1	3	1.00	2.50
10	中	92.4	75.0	2	2	1.85	1.50
11	中	79.2	62.1	2	2	1.58	1.24
12	中	89.0	54.2	1	2	0.89	1.08
13	中	100.0	60.1	1	3	1.00	1.80
14	中	95.5	84.8	3	3	2.87	2.54
15	高	80.1	72.9	2	2	1.60	1.46
16	高	100.0	63.5	2	2	2.00	1.27
17	高	93.8	50.0	3	2	2.81	1.00
18	高	100.0	100.0	3	3	3.00	3.00
19	高	92.7	84.6	2	3	1.85	2.54
20	高	78.7	74.0	2	3	1.57	2.22
21	高	98.9	57.0	2	3	1.98	1.71
22	高	92.7	43.1	3	3	2.78	1.29
23	高	98.3	80.0	3	3	2.95	2.40
24	腺腫	90.0	42.6	3	2	3.00	0.85

*) ムチン様腺がん細胞が含まれていた。

**) このがんは脾臓の胞状細胞がんに類似した形態を有していた。

(がん組織中におけるタンパク質Mina 53とKi-67との間の染色パターンの比較)

連続切片を抗Ki-67モノクローナル抗体(MIB1)を用いて染色して、抗Mina53モノクローナル抗体での染色パターンと比較した。すでに報告されているように(Cattoretto, G., et al.: J Pathol 1992, 168:357-563; Jansson, A, Sun, X.F.: APMIS 1997, 105:730-734; Saarnio, J., et al.: Am J Pathol 1998, 153:279-285)、抗Ki-67モノクローナル抗体と抗Mina53モノクローナル抗体とは大腸がん細胞を強力に染色した(図7C、9B)。ほとんどの場合において、Ki-67とMina53に対する抗体は、図7B、図8C、図9Aならびに図9Bおよび表1と同様に、がん細胞を染色した。

顕微鏡視野内における染色細胞の割合をKi-67とMina53について調べたところ、両者に対する抗体の間には違いが見出され、大部分の場合においては、Mina53を発現している細胞の割合は、Ki-67を発現している細胞の割合よりも多かった(図9A、B)。これに対して、2、3の場合においては、Mina53を発現している細胞の割合がKi-67を発現している細胞の割合と同様であった(表1)。

なお、一つの場合(患者番号3)においては、調べた切片は3種類の異なる形のがんを含んでいたため、複雑な染色パターンが得られた。あまり分化していない上皮がん細胞とムチン様腺がん細胞を有する2つの領域では、タンパク質Mina53とKi-67との両者に対して陽性の細胞の割合は同様に高かった(表1)。これに対して、第3の領域においては、腫瘍は、脾臓の小葉がん類似した形態学的構造を有していて、抗Mina53モノクローナル抗体によってはほんのわずかしき染色されなかったのに対して、抗Ki-67モノクローナル抗体によっては強力に染色された。しかしながら、陽性の細胞の割合は上記2つの領域と比較して低かった(表1)。腺腫の場合には、形成異常の領域内のほとんどすべての細胞は抗Mina53抗体によって強く染色されているのに対して、抗Ki-67抗体によっては抗Mina53抗体の場合程高率には細胞が染色されてなかった(図9C、D)。わずかな例外があるけれども、これらの結果は、Mina53を発現する細胞の割合がKi-67を発現する細胞の割合よりも特徴的に高いことを示唆している。

(非腫瘍大腸組織におけるタンパク質Mina53とKi-67との間の染色パターンの比較)

非腫瘍大腸組織のある領域においては、Ki-67に対する抗体は細胞を強力に染色していたのに対して、Mina53に対する抗体はそれらの細胞を非常に弱くしか染色していなかった。抗Ki-67抗体による染色は、活発に増殖をしていると思われる腺窩の下部3分の1の部分に存在する細胞の核内において観察された(図9F)。また、非腫瘍大腸組織の腺窩における染色強度は、がん領域において見出され

た細胞とは実質的には異なっていなかった(図9 B、F)。他方、抗Mina 53モノクローナル抗体は、これらの細胞の核をわずかにしか染色せず、その染色強度はがん領域中に見出された細胞よりも一層弱いものであった(図9 A、E)。更に、高い有糸分裂活性を有する細胞を含むリンパ濾胞の胚中心は、Ki-67に対する抗体によって強力に染色されたけれども、抗Mina 53モノクローナル抗体によっては非常に弱くしか染色されなかった(図9 G、H)。

上記の結果から、細胞増殖マーカーとして繁用されているKi-67に比較して、がん細胞は、タンパク質Mina 53をより高い割合で発現することが確認された。Ki-67に対する抗体は、下部腺窩ならびにリンパ濾胞の胚中心の細胞を含む、がん細胞ならびにある種の十分に増殖している正常細胞を強力に染色した。他方、Mina 53に対する抗体はこれらの非腫瘍領域中の細胞を稀にしか染色しなかった。

これらの結果は、Mina 53の高発現を大腸がんの典型的な特長と見なすことができることを示している。したがって、Mina 53の発現は大腸がんに対するマーカーとして使用することができるとともに、正常組織に浸潤したがん細胞を見出すのにも有用であると考えられる。それに加えて、タンパク質Mina 53に対する染色は予後のマーカーとしても有用であると考えられる。

60%以上の大腸がんにおいて、がん発生の初期から、APC遺伝子内での体性突然変異が見出される(Miyoshi, Y., et al.: Hum Mol Genet 1992, 1:229-233; Powell, S.M., et al.: Nature 1992, 359: 235-237)。また、 β カテニンの突然変異は、APC突然変異が欠如している大腸腫瘍中に見出されている(Morin, P.J., et al.: Science 1997, 275: 1787-1790; Sparks, A.B., et al.: Cancer Res 1998, 58: 1130-1134)。APCタンパク質の主要な機能は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β (GSK-3 β)とアクシントタンパク質と連携した遊離 β カテニン量の調節であると考えられている(Hinoi, T., et al.: J Biol Chem 2000, 275: 34399-34406)。APCの機能損失、アクシンの不活性化(Behrens, J., et al.: Science 1998, 280:596-599)または β カテニンを活性化する突然変異(Polakis, P.: Curr Opin Genet Dev 1999, 9: 15-21)は、 β カテニンの細胞内蓄積をもたらすことになり、核に転位したときには、幾種類かの特異的な標的遺伝子の発現を増加することになるT細胞因子(Tcf)依存転写のアクティベーターとして有用である(Roose, J., Clevers, H.: BiochimBiophys Acta 1999, 1424: M23-M37)。

最近、APC経路の標的としてのc-mycが同定され、c-mycがAPC遺伝子の機能損失によってまたは β カテニンの過剰発現によって惹起されることが示された(He, T.C., et al.: ibid)。したがって、APCもしくはアクシンの不活性化による突然変異または β カテニンの活性化による突然変

異は、c-mycの過剰発現を導くことになり、その結果Mina53の発現が高くなるものと考えられる。したがって、Mina53は、大腸がん発生に関係しているAPC/ β カテニン経路の下流の間接標的であると思われる。

これらの結果は、Mina53の高発現が大腸がんの典型的な特長と見なすことができることを示している。したがって、Mina53の発現は、大腸がんに対するマーカーとして使用することができるとともに、正常組織に浸潤したがん細胞を見出すのに有用であると考えられる。それに加えて、Mina53の染色は予後のマーカーとしても有用であると考えられる。

その上、タンパク質Mina53の発現パターンを、細胞増殖のバイオマーカーとして広く使用されているKi-67の発現パターンと比較すると、ほとんどのがん組織において、Mina53を発現している細胞の割合が、Ki-67を発現している細胞の割合よりも特長的に高いことが判明した(表1)。このことは、遺伝子Mina53がMyc標的遺伝子であるという事実に基づいていると思われる。c-mycは、増殖細胞の細胞サイクルのいずれの相中においても連続的に発現している(Rabbitts, P.H., et al.: EMBO J 1985, 4:2009-2015; Waitz, W., Loidl, P.: Oncogene 1991, 6:29-35)。これに対して、Ki-67は、後期G1相、S相、M相およびG2相の増殖中の細胞内で優先的に発現している(Gerdes, J., et al.: Int J Cancer 1983, 31:13-20; Gerdes, J., et al.: J Immunol 1984, 133:1710-1715)。Mina53は、c-mycによって生起されるので、Mina53ががん組織中においてKi-67よりもより広範に発現されていることは理屈に適っている。

十分に生育した腺窩における細胞は、Ki-67に対する抗体によって強く染色されたのに対して、タンパク質Mina53に対する抗体によって弱くしか染色されなかった。また、非腫瘍性であるが増殖している細胞を含むリンパ濾胞の胚中心内の細胞は、抗Mina53抗体によって弱くしか染色されないが、抗Ki-67抗体によって強く染色された。本発明者らは、c-mycが高度に発現している2種類の培養した細胞株、つまりヒト子宮頸がんHeLa細胞ならびにラット線維芽細胞における細胞増殖のためMina53が重要な因子であることをすでに示している(Tsuneoka, M., et al.: *ibid*)。従って、タンパク質Mina53は、いくつかの限られたタイプの細胞においてだけ細胞増殖のために重要な役割を果たしているのかもしれない。あるいは、腺窩ならびにリンパ濾胞の胚中心の正常細胞は、より少ない量のMina53で増殖するかまたはタンパク質Mina53と同様の機能を有する別のタンパク質を発現している可能性がある。いずれの場合でも、がんでない細胞に比べてがん細胞が抗Mina53抗体によって強力に染色されるので、Mina53はがん発生との関係を有していると考えられる。

更に、食道がん組織を、抗Mina 53モノクローナル抗体によって染色して得られた染色インデックスを、ヒト食道がんを染色するために現在使用されている抗Ki-67モノクローナル抗体によって染色して得られた染色インデックスと比較したところ、その染色程度には相関が見られたけれども、明らかな違いが認められた。つまり、図13に示すように、抗Ki-67モノクローナル抗体による染色程度が高いものでは、ほとんど抗Mina 53モノクローナル抗体の染色程度が高かった。これに対して、抗Ki-67モノクローナル抗体による染色程度がほとんど見られないものでも、抗Mina 53モノクローナル抗体の染色程度が高いものがあつた。このことは、抗Mina 53モノクローナル抗体が抗Ki-67モノクローナル抗体よりも食道がん組織をよく染色することを示している。

次に、食道がんの手術後の生存月数とMina 53の染色インデックスとKi-67の染色インデックスとの間に相関関係が見られるかを、生存月数が確認できる33例について調べたところ、図12に示すように、生存月数とMina 53の染色インデックスの間には明らかな相関関係が認められた($p<0.011$)。これに対して、Ki-67ではそのような相関関係は認められなかった。

そこで、食道がん患者をMina 53発現が高いグループと低いグループの2つに分け、それぞれのグループをカプランマイヤー法により解析したところ、図12(A)の結果に示すように、2つのグループでは累積生存率に明らかな相違が認められた。これに対して、Ki-67についても同様の解析を行ったところ、図12(B)に示すように、Mina 53のようなハッキリとした違いは認められなかった。そこで、食道がん患者の手術後の生存月数とMina 53の染色インデックスあるいはKi-67の染色インデックスとの関係を表2に示す。

表2:

	例 数	相 関	p 値
Mina 53	33	-0.436	0.0104
Ki-67	33	-0.83	0.6499

上記の結果から、Mina 53モノクローナル抗体による染色程度は食道がんの悪性度と関係することが示唆しているものと考えられる。

また、タンパク質Mina 53のアミノ酸配列の128から271の領域にJmjCドメインという部分がある(Tsuneoka, M., et al.: ibid)。このドメインは、多くの遺伝子の間での配列の類似性

に基づいて最近同定されたものであり、Jm j Cドメインを持つ蛋白質はほとんどの場合DNA結合もしくはクロマチン結合ドメインを持っている (Clissold, P.M., Ponting, C.P.: Trends Biochem Sci 2001, 26:7-9)。このJm j Cドメインは、クピンフォールド (cupin fold) を採用しているものと予測され、クロマチン再構築を規制する金属酵素の候補である (Clissold, P.M., Ponting, C.P.: ibid)。各腫瘍は、そのいずれもが腫瘍を進行させる一連の遺伝子的ならびに遺伝子配列の変化を伴わない変化による独立したプロセスの結果である (Fearnhead, N.S., et al.: Br Med Bull 2002, 64:27-43)。遺伝子配列の変化を伴わない変化の一つであるクロマチン再構築は、遺伝子の発現に影響を及ぼし、がん発生の一因となりうる。Mina 53が核内に局在していることは、タンパク質 Mina 53がクロマチン再構築により腫瘍の進行に関わっている可能性を支持しているように思われる。しかしながら、このことを明らかにするには、クロマチン再構築がMina 53の真の機能であるかどうかを決定する必要がある。

がん遺伝子が活性化することが発がんに関連していることはあきらかであるから、かかるがん遺伝子の不活性化を目標としたヒトのがんに対する処置についての薬理学的戦略も重要となってくる。かかる戦略に基づいてがん遺伝子を不活性にするように設計された医薬品が開発されがんの処置も一段と発展することが期待される。しかしながら、かかる医薬品を長期間使用すると、その医薬品はまた正常細胞に対しても致命的なシグナル経路を切断することになり、重篤な毒性を及ぼすことも考えられる (Jain, M, et al.: Science 2002, 297:102-104)。また、最近の研究によって、mycファミリーのがん遺伝子は、細胞生育の中心的な調節因子と考えられ、それらのがん遺伝子が臓器発達ならびに再生を含む正常な生物学的プロセスにおいても決定的に必要であることが明らかにされてきている (Henriksson, M, Luscher, B.: Adv Cancer Res 1996:109-182; Grandori, C, et al.: Annu Rev Cell Dev Biol 2000, 16:653-699; Luscher, B.: Gene 2001, 277:1-14; Stanton, B.R., et al.: Genes Dev 1992, 6:2235-2247; Sawai, S, et al.: Development 1993, 117:1445-1455)。上述したように、c-mycは様々な遺伝子の発現を調節し、特異的なMyc標的遺伝子はMycのそれぞれの機能において実質的な役割を果たしているものと考えられる。

産業上の利用可能性

この発明によって同定したc-Mycによって調節される新規ながん関連遺伝子mina 53は、がん遺伝子mycによって直接発現調節されていること、核に存在する分子量5万3千のタンパク質Mina

53をコードしていること、細胞増殖に関連していること、がん組織において特異的に発現が上昇していること、などによってがん関連分野において種々の応用が可能である。つまり、この発明に係る新規な遺伝子mina53は、がん細胞において特異的に発現が上昇することからがんの診断に応用が可能である。また、がん細胞の増殖抑制がMina53タンパク質の発現を抑制することにより観察されることから、遺伝子治療などによりmina53遺伝子の発現を抑制したり、またはMina53活性を特異的に抑制することができる新薬の開発にも応用できることになる。

また、この発明に係るmina53遺伝子ならびにその産物は、がん細胞などの正常でない細胞の診断およびかかる細胞の増殖を制御することも可能である。

更に、この発明に係る抗Mina53モノクローナル抗体によって、ヒト大腸がん細胞においてタンパク質Mina53が高発現していること、またヒト大腸がん組織においては正常上皮に比べて原発のがん組織や筋層やリンパ管に侵入していたがん細胞でタンパク質Mina53が高発現していることを確認することができる。Mina53タンパク質の発現は、細胞増殖マーカーとして繁用されているKi-67タンパク質の発現と良く似ていて、細胞増殖マーカーとして有効に利用することができるが、がん細胞におけるMina53タンパク質発現に対する陽性細胞の比率はKi-67タンパク質のものに比べて高いことが確認された。更に、大腸正常上皮の細胞分裂が盛んな領域では、Ki-67の強い発現が見られたのに対し、Mina53の発現は高くはなかった。その上、リンパ濾胞の胚中心（正常組織）に強いKi-67発現が見られたが、Mina53発現は高くなかった。これらのことから、Mina53タンパク質はKi-67よりもがん特異性が高いと思われる。

これらの結果から、Mina53の発現が大腸がんの初期事象であるとともに、Mina53の高発現を大腸がんの典型的な特長と見なすことができることが示されているので、Mina53の発現を大腸がんに対するマーカーとして利用することができる。また、Mina53の発現を正常組織に浸潤したがん細胞を検出するのに利用することができるものと考えられる。更に、Mina53が染色できることは予後のマーカーとしても有用であると考えられる。

同様に、抗Mina53モノクローナル抗体は、食道がん細胞を、現在ヒト食道がん細胞の染色に使用されている抗Ki-67モノクローナル抗体よりもよく染色することを確認した。さらに、抗Mina53モノクローナル抗体による食道がん細胞の染色具合によって食道がんの悪性度を診断することも可能である。

この発明に係る抗Mina 53モノクローナル抗体は、大腸がん、食道がん、舌がん、乳がん、肉腫、脳腫瘍などのがん細胞を良く染色することができることから、Mina 53を各種がんの診断に利用することも可能である。一方、Mina 53タンパク質の発現を抑制すると、細胞増殖を強く抑制することができることから、Mina 53活性を抑えることによってがん治療への応用も可能である。

一方、Mina 53タンパク質やMina 53をコードするmRNAを組織中で検出し、がん細胞などの正常でない細胞を検出して診断に利用することができる。このような場合には、特異的抗体、例えば、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのMina 53タンパク質に結合する物質や、mina 53遺伝子を含む配列を有するRNA、DNAなどを利用することもできる。

また、この発明においては、組織片に含まれるMina 53の発現量を、例えば、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのMina 53タンパク質に結合する物質を利用して、ELISA法、ウェスタンブロット法もしくは関連手法によって測定することにより、細胞の状態を測定することもできる。更に、mina 53遺伝子を含む配列を有するRNA、DNAなどを利用して、ノーザンブロッティング法、RNaseプロテクション法、RT-PCR法、cDNAマイクロアレイ法などの各種測定法によって細胞の状態を診断することもできる。この発明においてはまた血中、尿中などのMina 53タンパク質の量を測定することによってもがん細胞を診断することが可能である。

更に、Mina 53タンパク質に対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などの抗体を利用することにより、当該技術分野において慣用されているELISA法などの手法により体内に存在するがん細胞などの正常状態にない細胞の存在の有無やその量を推定もしくは測定して診断をすることも可能である。

その上、この発明では、がん細胞などの正常状態にない細胞の増殖を制御することも可能である。Mina 53活性を抑制するためには、例えば、siRNA (small RNA interference RNA) 法、アンチセンス核酸法、プロモーターの相同配列の核酸導入法、プロモーターのデコイ法、リボザイム法などを利用することができるとともに、Mina 53に結合する物質（例えば、抗体などのタンパク質やより低分子の化合物など）も利用することができる。また、Mina 53のタンパク質や核酸配列に利用しうる物質、例えば、特異的抗体やmina 53発現を抑制する siRNAなどや、上記物質を選択するためのスクリーニングなどの方法も利用することができる。

請 求 の 範 囲

1 がん関連遺伝子m i n a 5 3が10個のエクソンから構成され、最上流側にエクソン1が転写開始部位として存在し、エクソン2に翻訳開始部位が存在し、最後のエクソン10に停止コドンが存在することを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

2 請求の範囲第1項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、エクソン1がエクソン1 aとエクソン1 bとからなり、エクソン1 bがエクソン1 aの0. 25 k b下流に存在することを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

3 請求の範囲第1項または第2項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、エクソン5とエクソン6との間にエクソン5' が存在することを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

4 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、前記がん関連遺伝子m i n a 5 3が配列番号1で示される塩基配列を有するヒトがん関連遺伝子m i n a 5 3であることを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

5 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、前記がん関連遺伝子m i n a 5 3が配列番号2で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子m i n a 5 3であることを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

6 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、前記がん関連遺伝子m i n a 5 3が配列番号3で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子m i n a 5 3であることを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

7 請求の範囲第1項ないし第6項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、前記がん関連遺伝子m i n a 5 3が分子量5 3 k D aを有するタンパク質をコードしていることを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

8 請求の範囲第1項ないし第7項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、前記がん関連遺伝子m i n a 5 3が該遺伝子の発現を調節する転写因子であるM y cタンパク質が結合する塩基配列を持っていることを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

9 請求の範囲第1項ないし第8項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、前記タンパク質が核小体に局在していることを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

1 0 請求の範囲第1項ないし第9項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、前記がん関連遺伝子m i n a 5 3の発現がc - m y c遺伝子によって誘発されることを特徴とするがん関連遺伝子m i n a 5 3。

1 1 請求の範囲第4項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3において、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有する細胞増殖作用を有するヒトタンパク質M i n a 5 3。

1 2 請求の範囲第1項ないし第1 0項のいずれか1項に記載のがん関連遺伝子m i n a 5 3をコードしていることを特徴とするプラスミド。

1 3 請求の範囲第1 1項に記載のヒトタンパク質M i n a 5 3をコードしていることを特徴とするプラスミド。

1 4 請求の範囲第1項ないし第1 0項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子m i n a 5 3の特定部位を含むヒトm i n a 5 3ゲノミックDNAフラグメントを、ルシフェレースcDNAに結合すること
を特徴とするレポータープラスミド。

15 請求の範囲第1項ないし第10項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子mina53または請求の範囲第11項に記載するヒトタンパク質Mina53もしくはそのフラグメントを抗原として抗体を得ることを特徴とするmina53もしくはMina53に対する抗体。

16 請求の範囲第1項ないし第10項のいずれか1項に記載するがん関連遺伝子mina53もしくはそのフラグメントを用いてMina53発現調節をするための核酸であることを特徴とするMina53発現調節のための核酸。

17 タンパク質Mina53に対するモノクローナル抗体。

18 タンパク質Mina53に対する抗Mina53モノクローナル抗体を用いてタンパク質Mina53をがん細胞またはがん組織中に検出することを特徴とするタンパク質Mina53の検出方法。

19 請求の範囲第18項に記載するタンパク質Mina53の検出方法において、前記がん細胞が大腸がん細胞または食道がん細胞であることを特徴とするタンパク質Mina53の検出方法。

20 請求の範囲第19項に記載するタンパク質Mina53の検出方法において、前記がん組織が大腸がん組織または食道がん組織であることを特徴とするタンパク質Mina53の検出方法。

21 タンパク質Mina53に対する抗Mina53モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Mina53を染色することを特徴とするタンパク質Mina53の染色方法。

22 請求の範囲第21項に記載するタンパク質Mina53の発現方法において、前記がん細胞が大腸がん細胞または食道がん細胞であることを特徴とするタンパク質Mina53の染色方法。

23 請求の範囲第21項に記載するタンパク質Mina53の発現方法において、前記がん組織が大腸がん組織または食道がん組織であることを特徴とするタンパク質Mina53の染色方法。

24 請求の範囲第21項ないし第23項のいずれか1項に記載するタンパク質Mina53の染色方法によってがん細胞またはがん組織を染色することによってがんを診断することを特徴とするがんの診断方法。

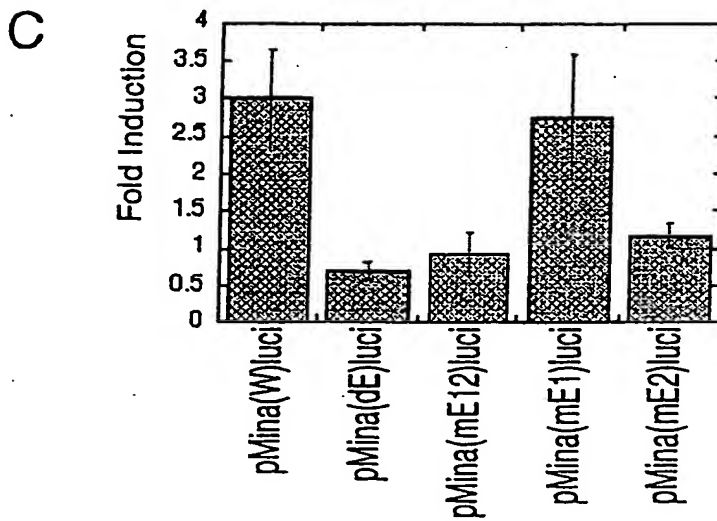
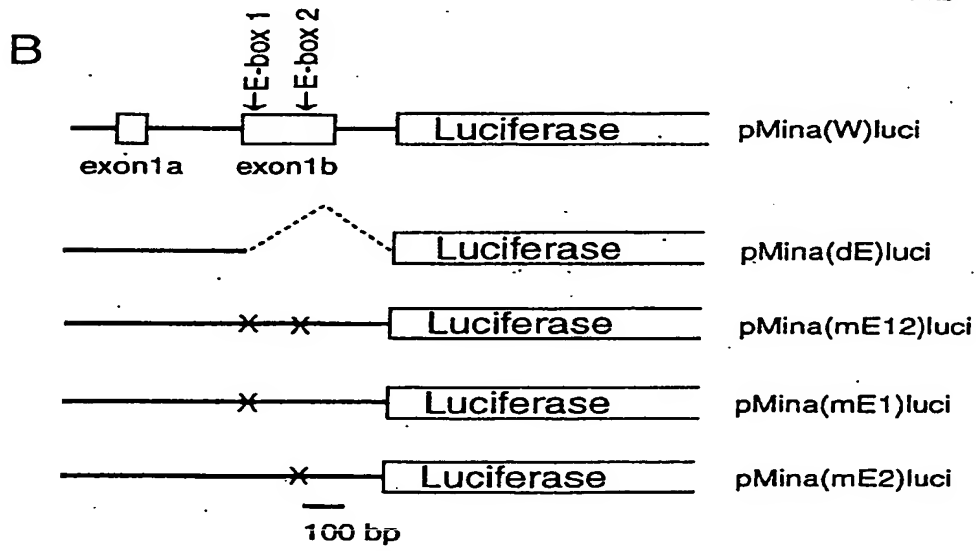
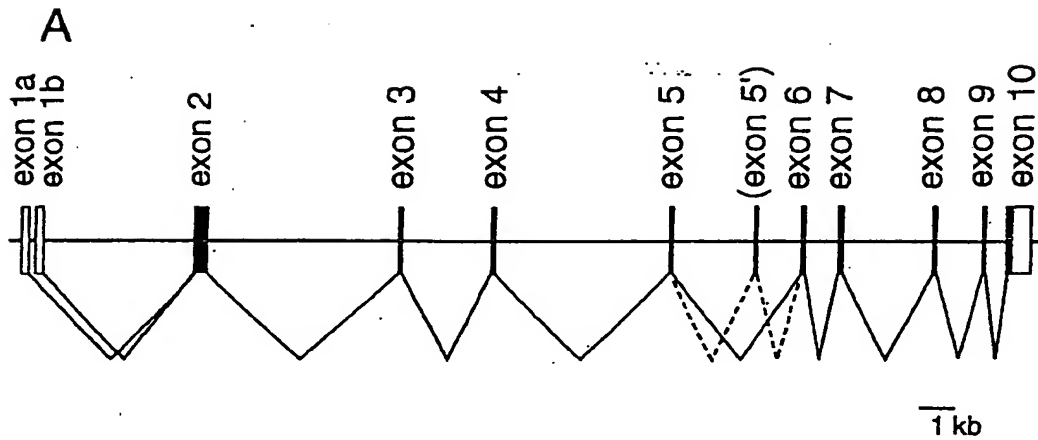
25 請求の範囲第24項に記載するがんの診断方法において、前記がんが大腸がんまたは食道がんであることを特徴とするがんの診断方法。

Mycタンパク質は細胞増殖の偏在性仲介物質であり、E-ボックスを介した遺伝子発現を活性化する。mina53遺伝子は、分子量53kDaを有するタンパク質をコードしていて、核質および核小体中に存在している。静止期にある細胞が血清によって活性化されたとき、c-myc mRNAのレベルの上昇に続き、mina53 mRNAが上昇した。ヒト前骨髄性白血病HL60細胞中において、c-mycの発現がTPAによって減少したときには、mina53 mRNAとタンパク質は減少した。活性化ドメインを欠損した変異型c-Mycではなく、野生型c-Mycの異所性発現はmina53の発現を上昇した。mina53 mRNAとタンパク質の発現はc-Mycの活性の人為的導入によって誘発することもできる。また、c-Myc ERキメラタンパク質中のc-Mycが活性化したときに、タンパク質合成に対するインヒビターが存在してもmina53 mRNAが増加する。一方、mina53遺伝子の転写開始部位に近接してE-ボックス部位があり、mina53プロモーターからの発現は、E-ボックスを介してc-Mycによって活性化される。c-Mycタンパク質は、TPA処理後ではなく、増殖相のHL60におけるインビボ(in vivo)でのmina53プロモーター領域に結合している。その上、HeLa細胞中と、高発現するc-mycを有するラット繊維芽細胞3Y1細胞中でのmina53発現の特異的抑制は細胞増殖を著しく抑制する。これらの結果を合わせると、mina53はMyc標的遺伝子であり、哺乳動物の細胞増殖への関連を示している。

また、抗Mina53モノクローナル抗体は、がん細胞、特に大腸がんや食道がんの細胞や組織中に発現しているタンパク質Mina53を特異的に認識することができるので、がん疾患の診断に利用することができる。

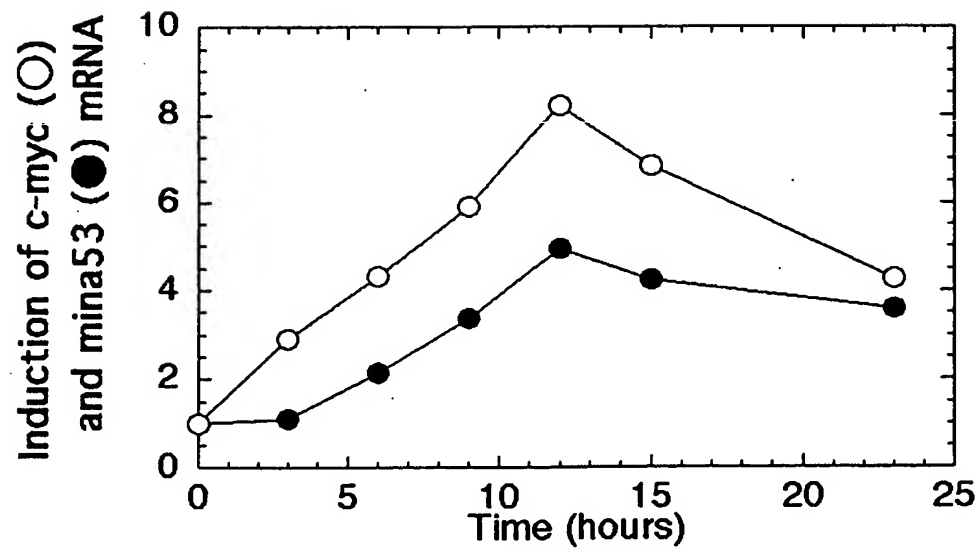
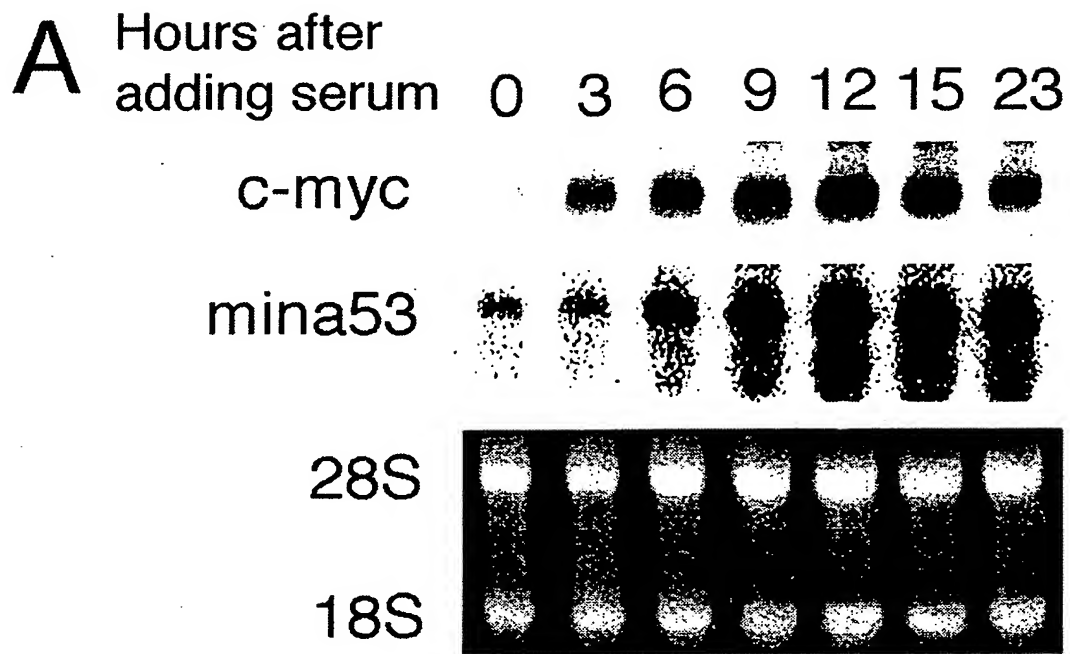
1/13

1



2/13

図 2



2/1/13

图 2

B

Hours after
adding TPA

0 3 7 9 12 24

c-myc



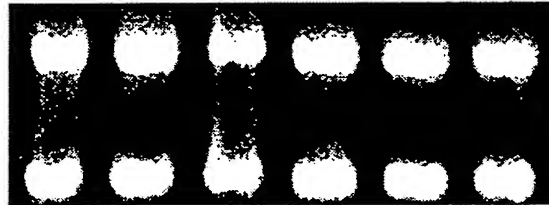
mina53



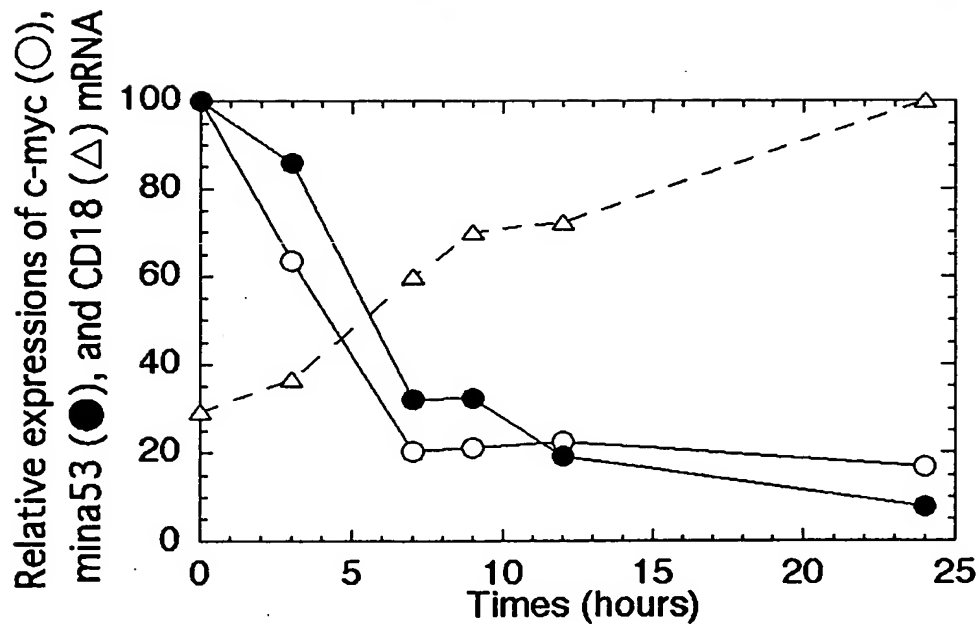
CD18



28S



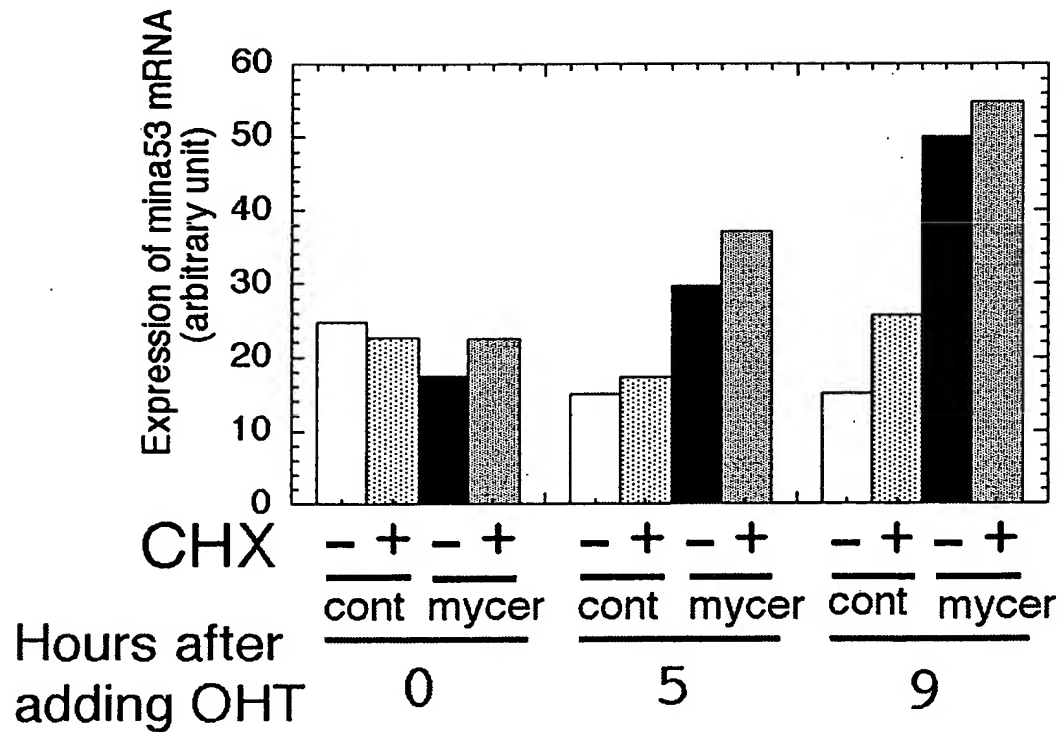
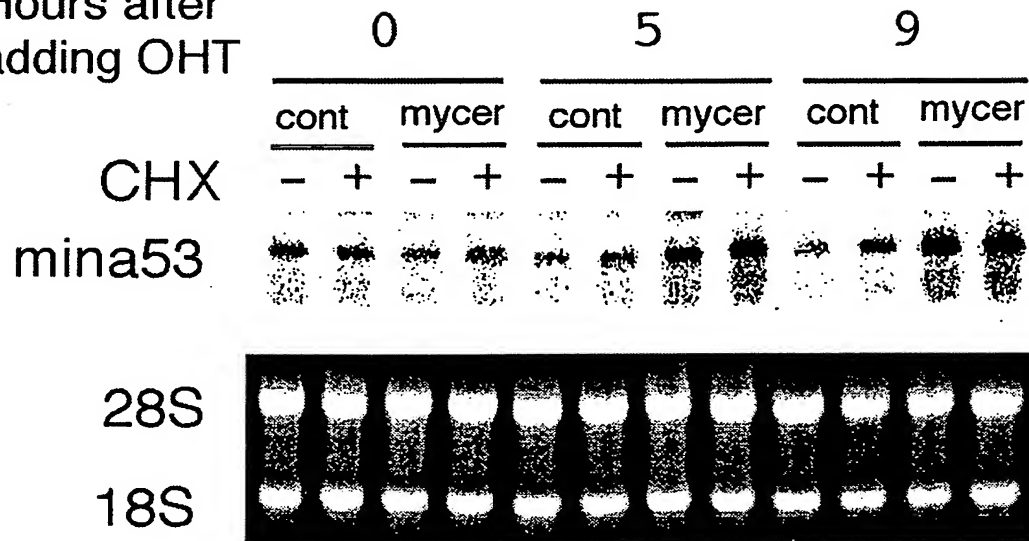
18S



2/2/13

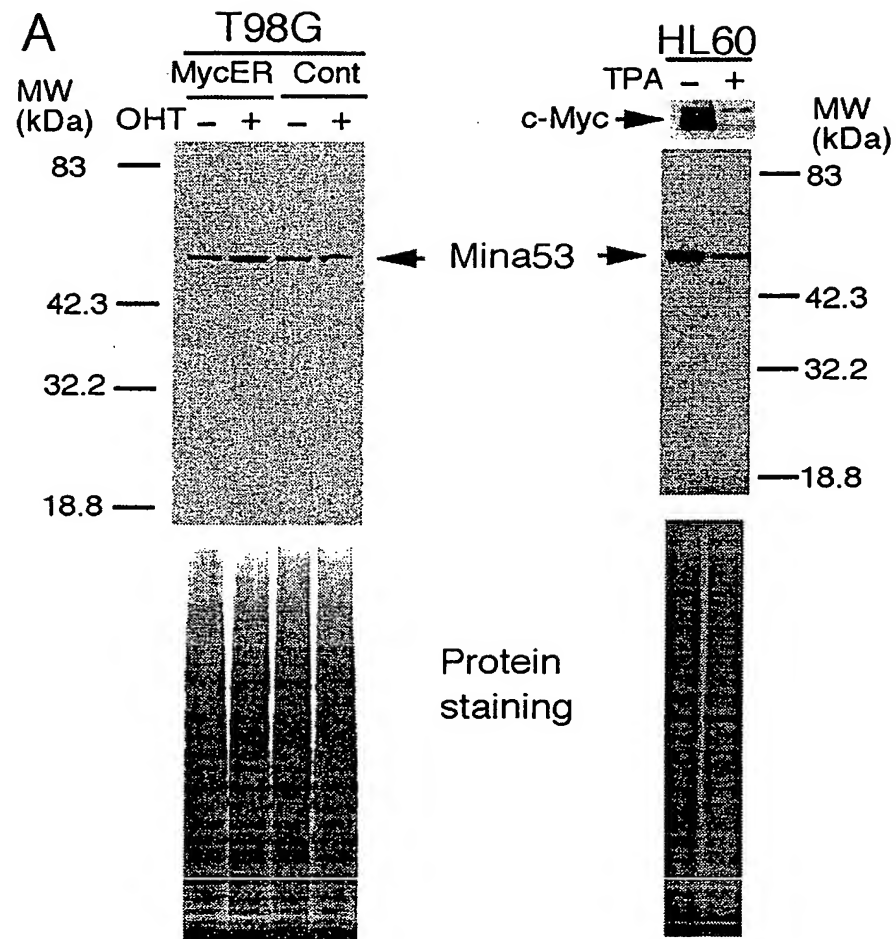
图 2

C

Hours after
adding OHT

3/13

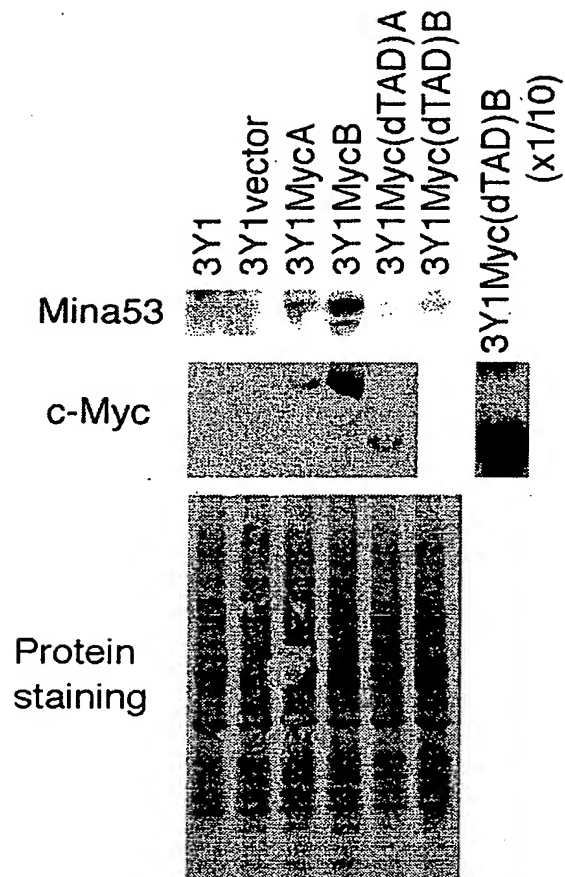
図3



3/1/13

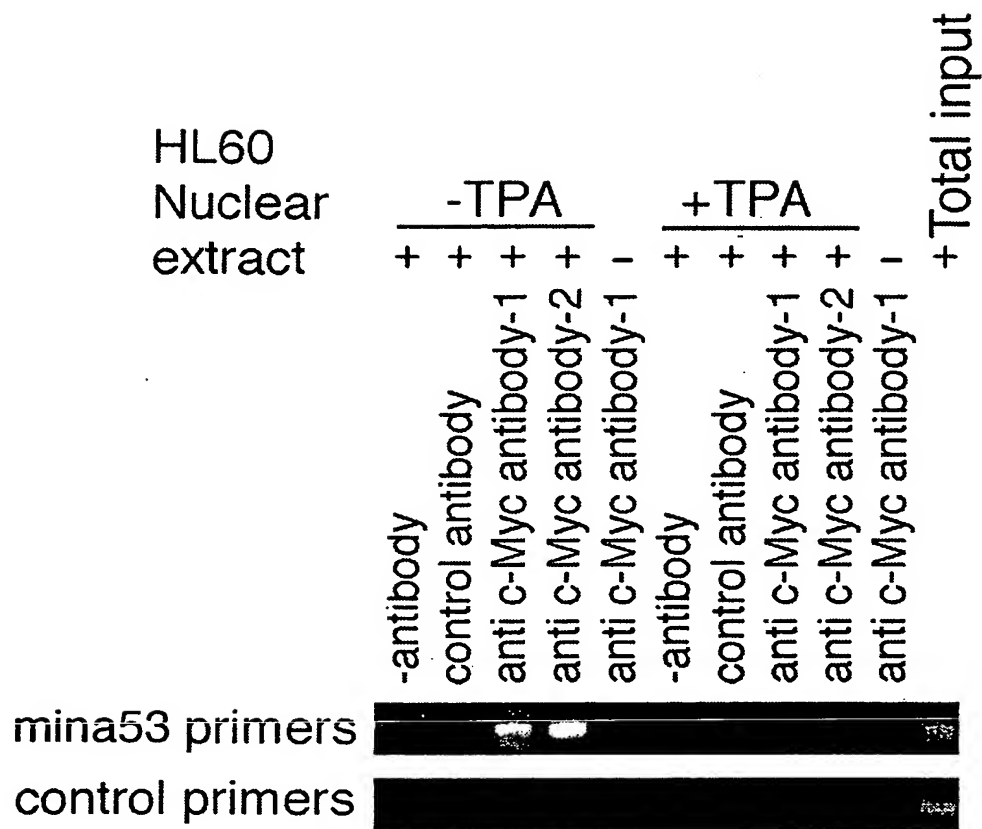
3

B



4/13

图 4



5/13

図5

A

HeLa3Y1MycBcont siRNA
human siRNA
rat siRNAcont siRNA
human siRNA
rat siRNA

Mina53

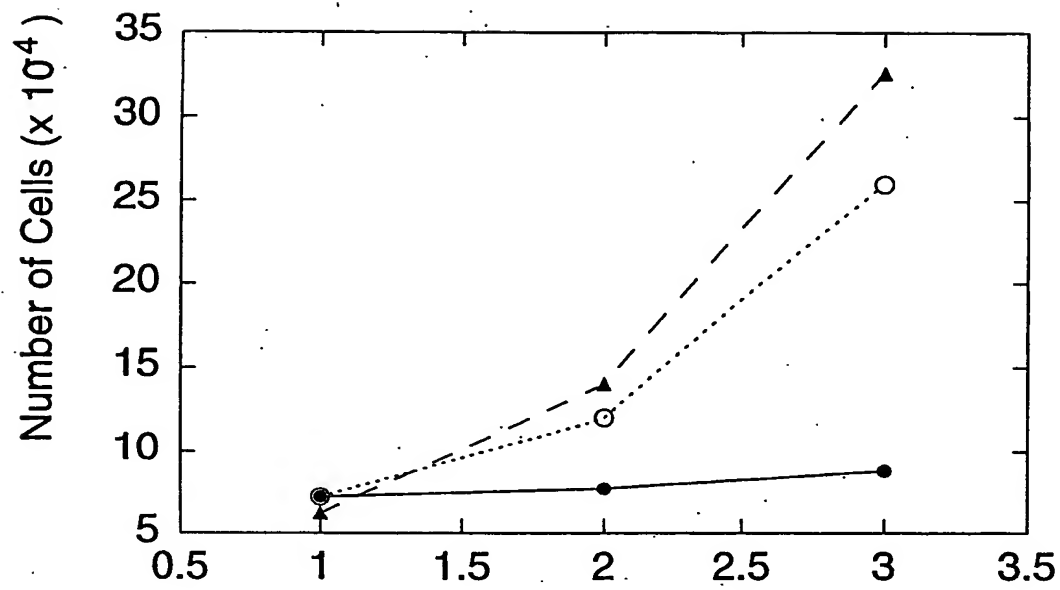


5/1/13

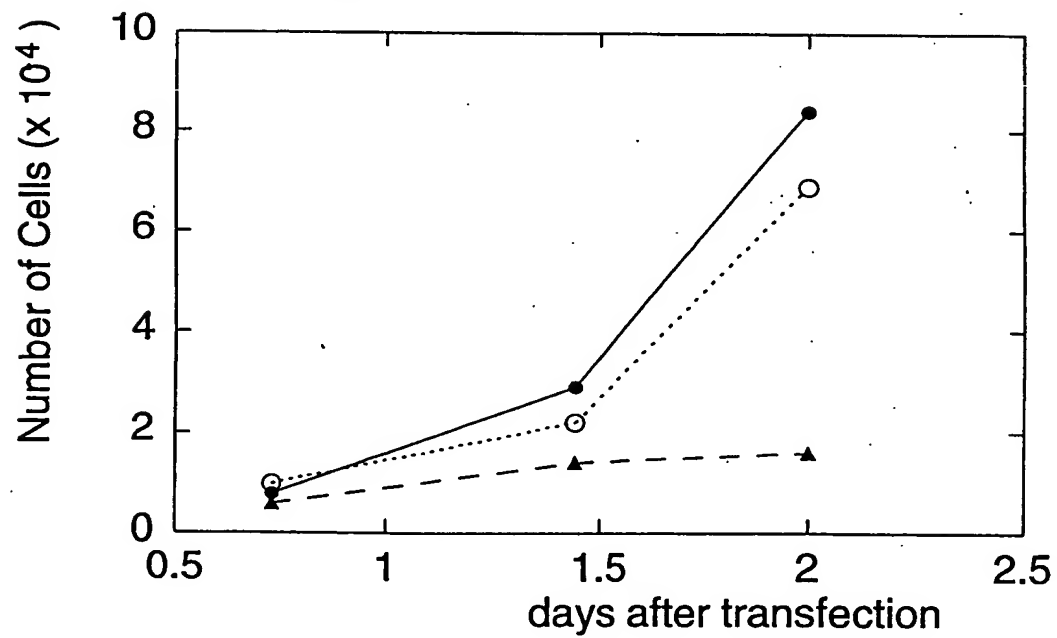
图 5

B

HeLa



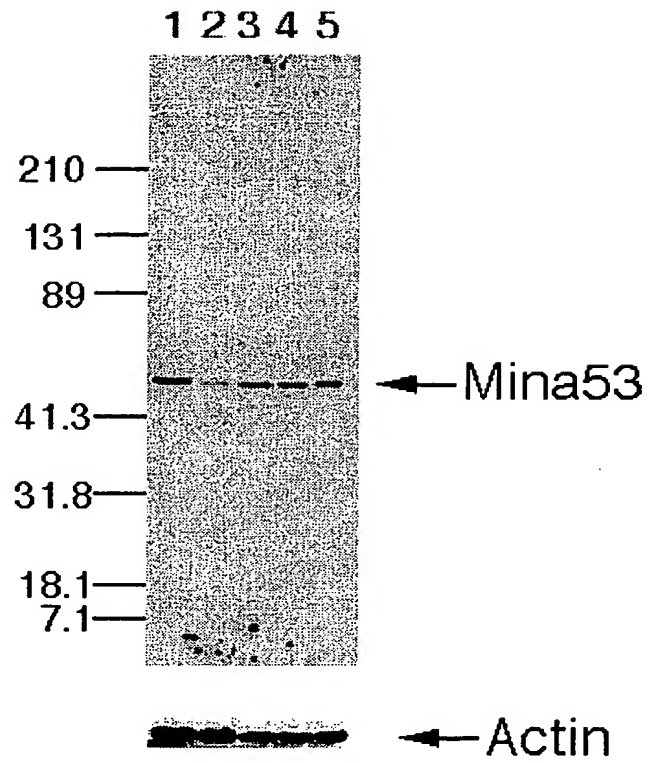
3Y1MycB



6/13

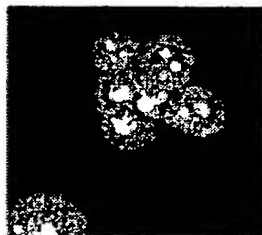
図6

A



B

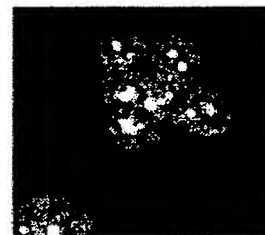
(a)



(b)

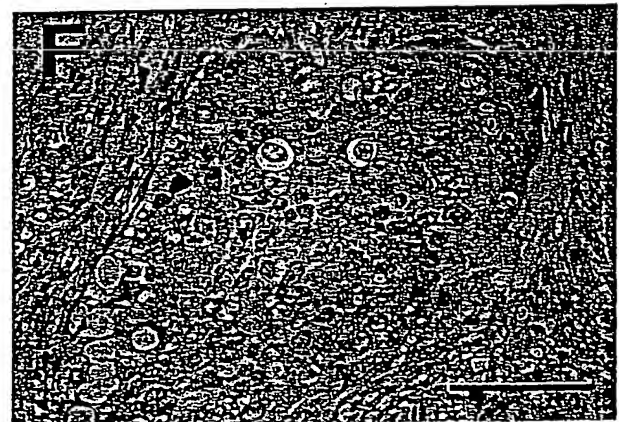
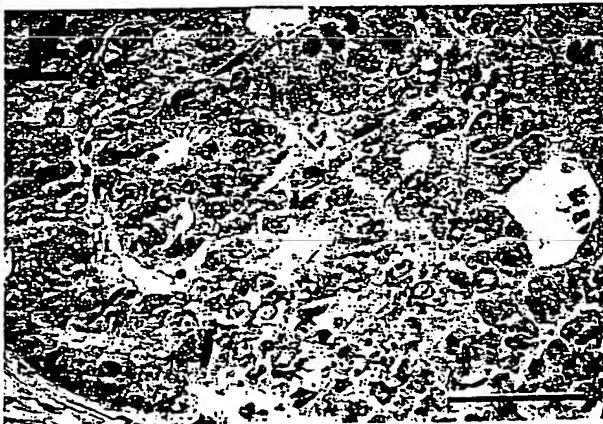
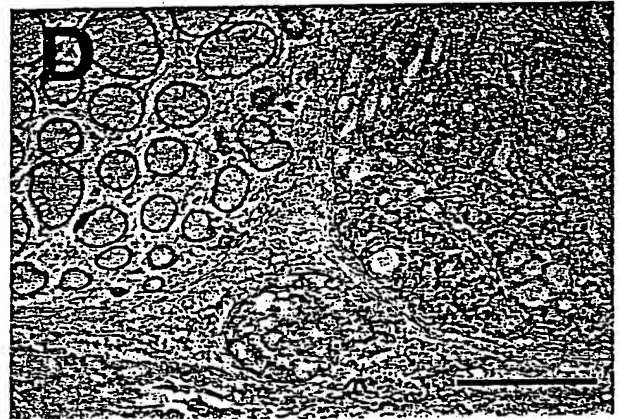
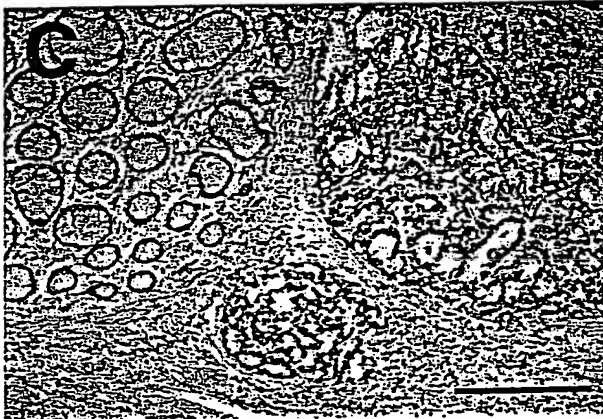


(c)



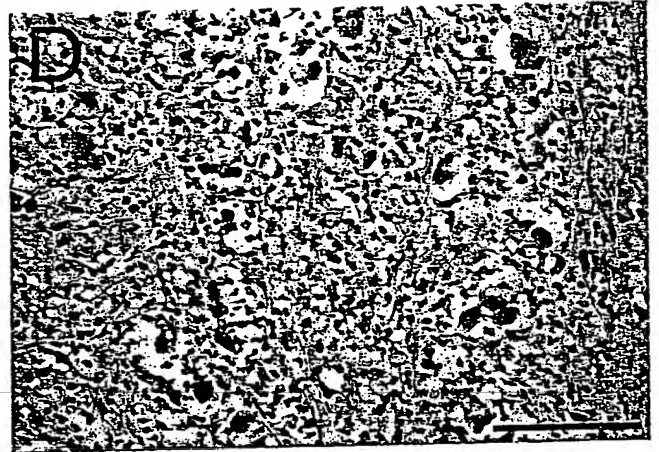
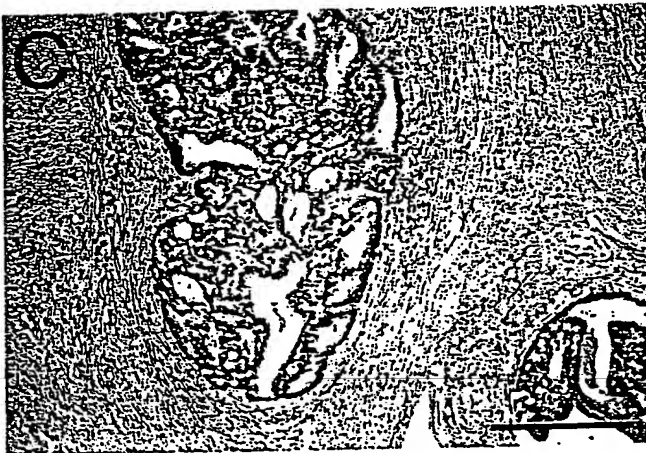
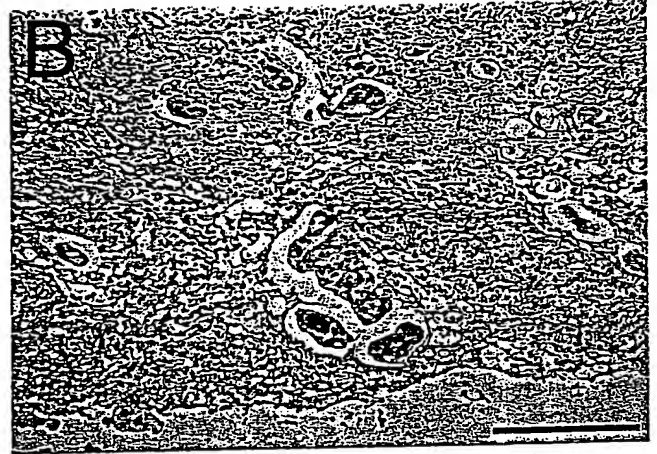
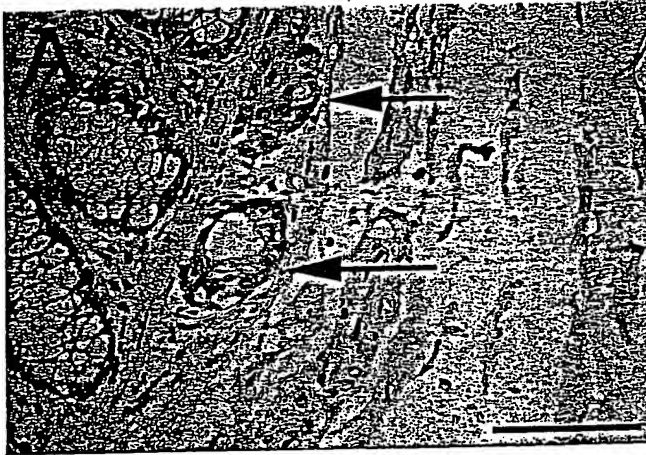
7/13

图 7



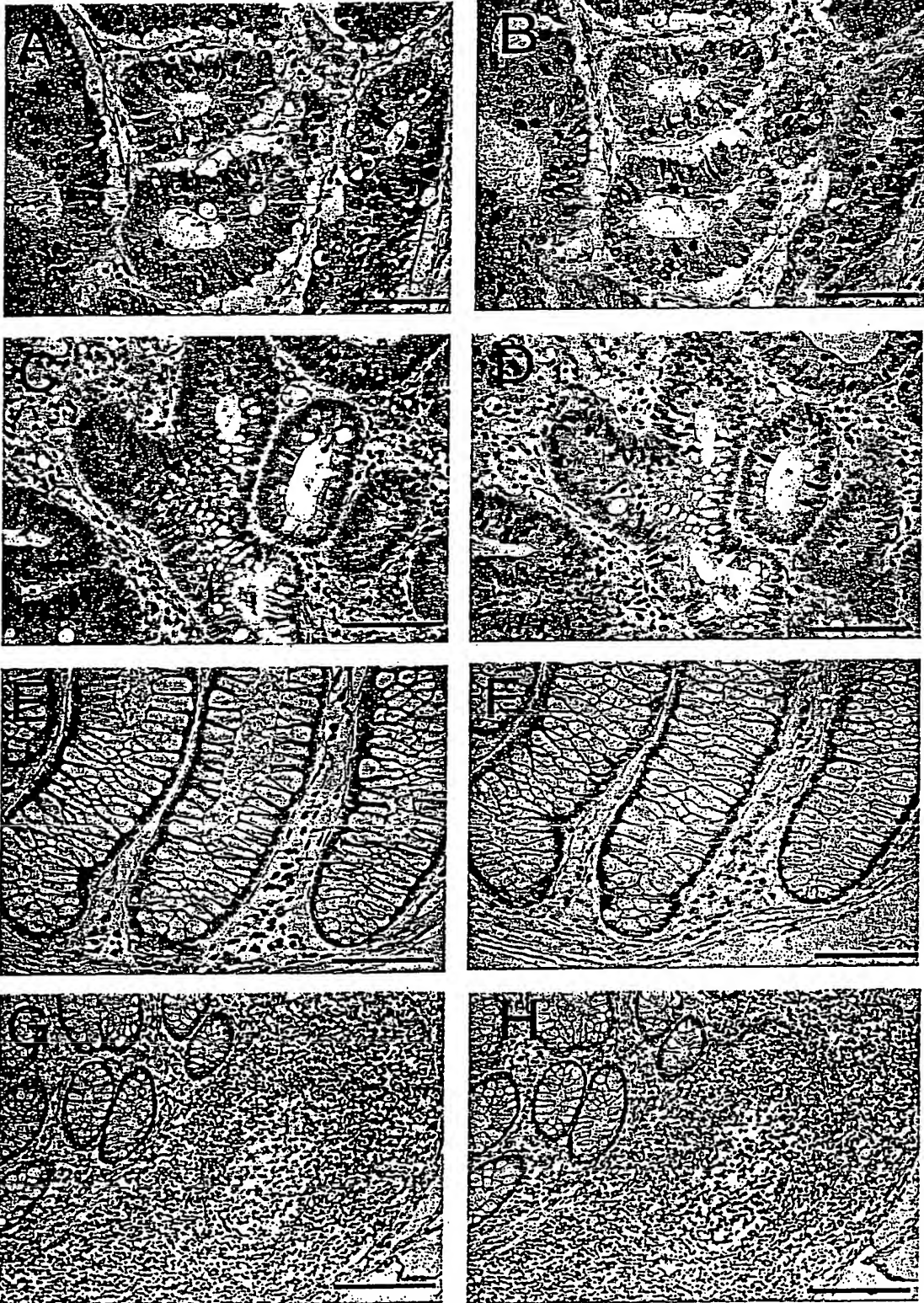
8/13

图 8



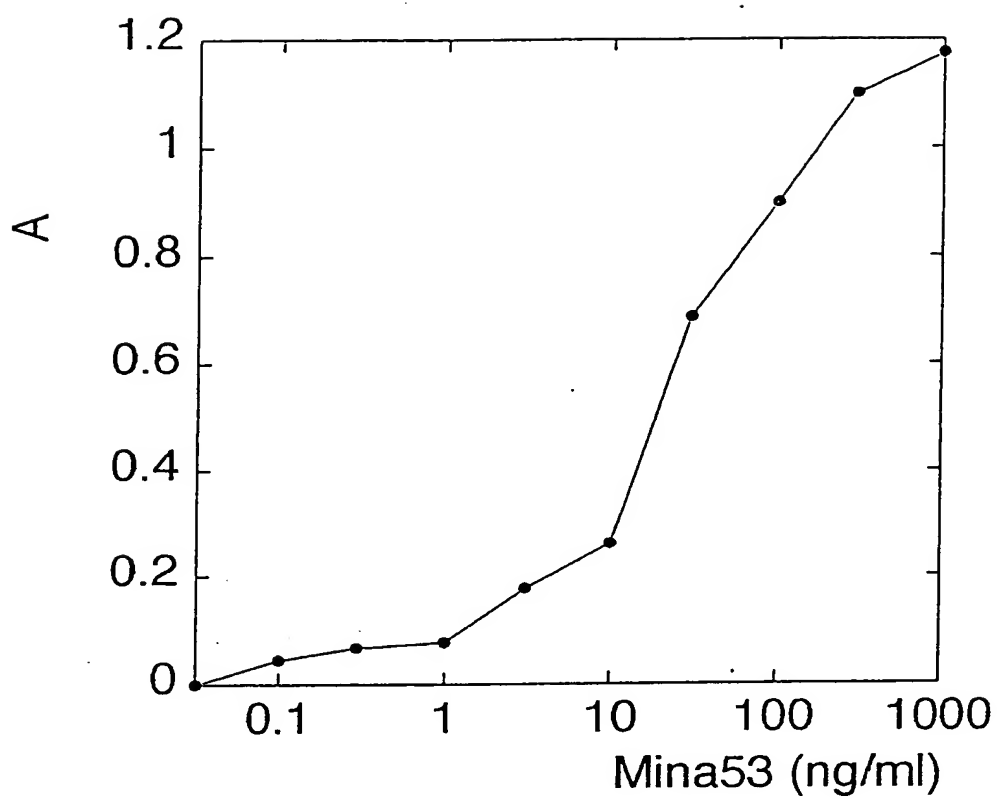
9/13

图 9



10/13

图10



11/13

图11

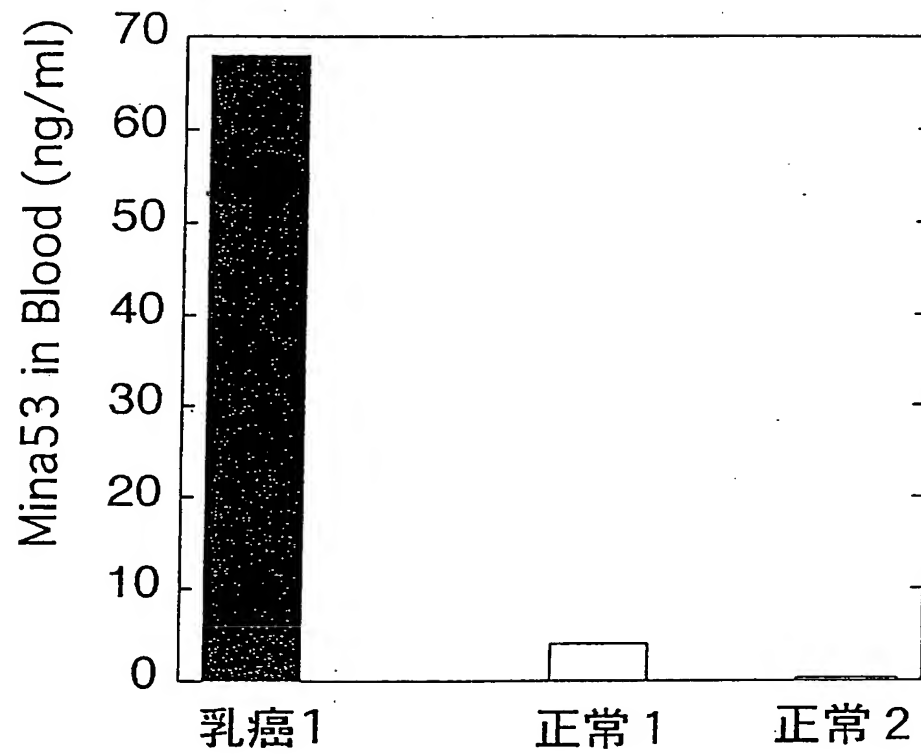
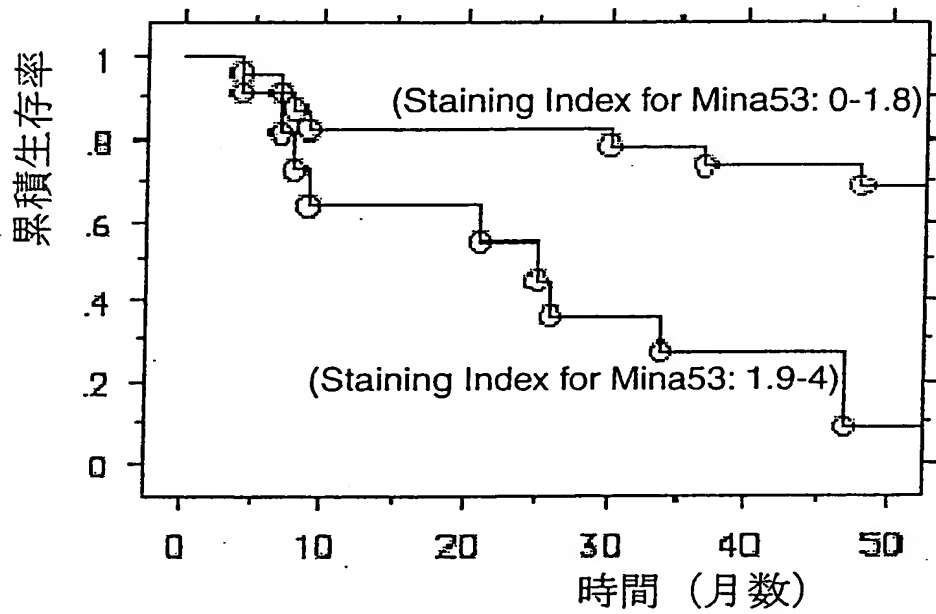
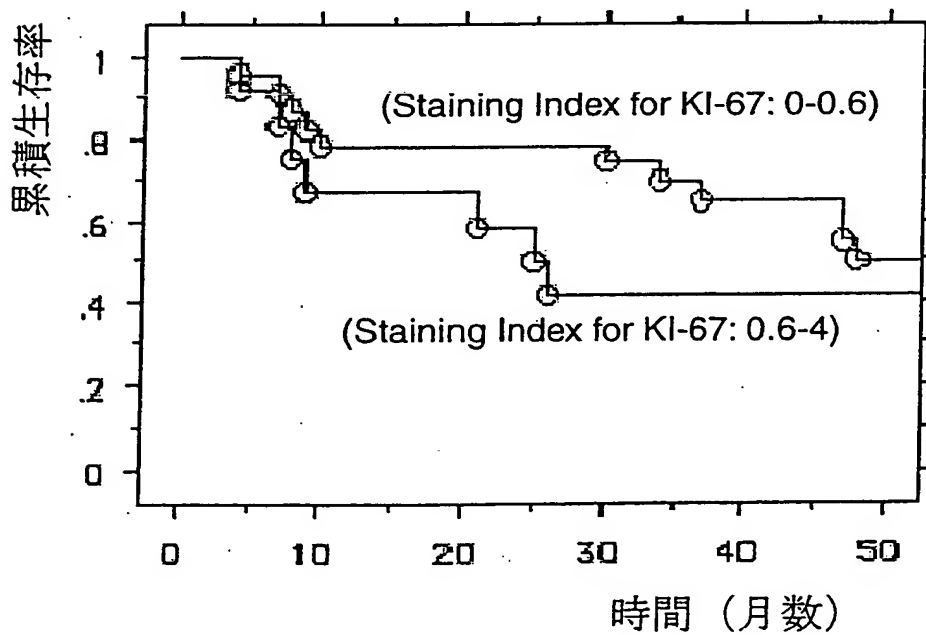


図12

A, Mina53と食道癌累積生存率との関係



B, Ki-67と食道癌累積生存率との関係



13/13

图13

